

Министерство образования и науки Российской Федерации

УДК 547.7/8 + 547.9; 577.1 + 661.12.091.547

ГРНТИ 31.15.00 + 31.15.25. + 31.21.27

Инв. №

УТВЕРЖДЕНО:

Исполнитель:

**Федеральное государственное
автономное образовательное
учреждение высшего
профессионального образования
«Уральский федеральный университет
имени первого Президента России
Б.Н.Ельцина»**

От имени Руководителя организации

_____/_____/_____
М.П.

**НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ
ОТЧЕТ**

**о выполнении 3 этапа Государственного контракта
№ П2444 от 19 ноября 2009 г. и Дополнению от 15 марта 2010 г. №
1/П2444, Дополнению от 27 июля 2010 г. № 2, Дополнению от 16 марта
2011 г. № 3**

**Исполнитель: Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего профессионального
образования «Уральский федеральный университет имени первого
Президента России Б.Н.Ельцина»**

**Программа (мероприятие): Федеральная целевая программа
«Научные и научно-педагогические кадры инновационной России»
на 2009-2013 гг., в рамках реализации мероприятия № 1.2.2
Проведение научных исследований научными группами под
руководством кандидатов наук.**

**Проект: Гетероядерное спин-спиновое взаимодействие $1\text{H}-15\text{N}$, $13\text{C}-15\text{N}$, как подход для изучения особенностей строения и превращения
полиазотистых гетероциклов.**

Руководитель проекта:

_____/Деев Сергей Леонидович
(подпись)

**Екатеринбург
2011 г.**

СПИСОК ОСНОВНЫХ ИСПОЛНИТЕЛЕЙ
по Государственному контракту П2444 от 19 ноября 2009 на выполнение поисковых
научно-исследовательских работ для государственных нужд

Организация-Исполнитель: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

Руководитель темы:

кандидат химических наук, без ученого звания	_____ Деев С. Л.
	подпись, дата

Исполнители темы:

кандидат химических наук, без ученого звания	_____ Шестакова Т. С.
	подпись, дата

кандидат химических наук, доцент	_____ Ельцов О. С.
	подпись, дата

без ученой степени, без ученого звания	_____ Мусихина А. А.
	подпись, дата

без ученой степени, без ученого звания	_____ Халымбаджа И. А.
	подпись, дата

кандидат химических наук, без ученого звания	_____ Утепова И. А.
	подпись, дата

кандидат физико- математических наук, без ученого звания	_____ Шенкарев З. О.
	подпись, дата

без ученой степени, без ученого звания	_____ Серебренникова П. О.
	подпись, дата

без ученой степени, без
ученого звания

_____ Щербакова М. А.
подпись, дата

без ученой степени, без
ученого звания

_____ Вараксин М. В.
подпись, дата

РЕФЕРАТ

Отчет 74 с., 1 ч., 19 рис., 31 схем, 3 табл., 29 источн., 7 прил.

Ключевые слова: ТЕТРАЗОЛО[1,5-а]ПИРИМИДИНЫ, ТЕТРАЗОЛО[1,5-б][1,2,4]ТРИАЗИНЫ, ТЕТРАЗОЛО[5,1-с][1,2,4]ТРИАЗИНЫ, 1,2,4-ТРИАЗОЛО[1,5-а]ПИРИМИДИНЫ, АЗОСОЧЕТАНИЕ, 1,2,4-ТРИАЗОЛО[5,1-с][1,2,4]ТРИАЗИНЫ, КОНДЕНСАЦИЯ, АННЕЛИРОВАНИЕ, ИЗОТОПНОМЕЧЕННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, ИЗОТОПНОЕ ОБОГАЩЕНИЕ, СТАБИЛЬНЫЕ ИЗОТОПЫ, ГЕТЕРОЯДЕРНЫЕ КОНСТАНТЫ СПИН-СПИНОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ^{13}C - ^{15}N И ^1H - ^{15}N , 2D ЯМР-ЭКСПЕРИМЕНТЫ, СПЕКТРЫ 1D ЯМР, ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЯ.

В отчете представлены результаты исследований, выполненных по III этапу Государственного контракта № П2444 от 19 ноября 2009 г «Гетероядерное спин-спиновое взаимодействие ^1H - ^{15}N , ^{13}C - ^{15}N , как подход для изучения особенностей строения и превращения полиазотистых гетероциклов» по направлению «Физическая химия. Электрохимия. Физические методы исследования химических соединений» в рамках мероприятия 1.2.2. «Проведение научных исследований научными группами под руководством кандидатов наук» направления 1 «Стимулирование закрепления молодежи в сфере науки, образования и высоких технологий», федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы.

Цель работы – создание новых эффективных методов исследования особенностей строения и механизмов химического превращения, конденсированных полиазотистых гетероциклических соединений на основе комплексного подхода, который включает в себя анализ гетероядерных констант спин-спинового взаимодействия ^{13}C - ^{15}N и ^1H - ^{15}N , измерение химических сдвигов сигналов в спектрах ^{13}C и ^{15}N ЯМР и данные 2D ^{15}N - ^1H НМВС экспериментов.

Объект исследования – производные азоло[5,1-с][1,2,4]триазинов и азоло[1,5-а]пиримидинов - важный класс полиазотистых конденсированных гетероциклов.

Задачи III-го этапа работы:

- наработка изотопномеченых производных различных конденсированных азолоазинов, содержащих более одного атома ^{15}N в своей структуре для исследований с помощью спектроскопии ЯМР;

- проведение 1D ^{15}N и ^{13}C ЯМР исследований на обогащенных изотопом ^{15}N азолоазинах с мостиковым атомом азота;

- разработка методов измерения гетероспиновых взаимодействий ^{15}N - ^1H с использованием 2D ^{15}N - ^1H ЯМР-экспериментов, путем адаптации техники экспериментов, используемых в физико-химических исследованиях пептидов и белков.

- разработка методов доказательства строения конденсированных полиазотистых гетероциклов с использованием комплексного подхода: анализа КССВ ^{13}C - ^{15}N , данных спектров 1D ^{15}N и ^{13}C ЯМР, а также результатов 2D ^{15}N - ^1H НМВС ЯМР-экспериментов;

- использование анализа спин-синового взаимодействия ^{13}C - ^{15}N и ^{15}N - ^1H в комплексе с данными 2D ^{15}N - ^1H НМВС ЯМР-экспериментов;

- подведение итогов научно-исследовательской работы, разработка рекомендаций по использованию полученных результатов в области исследования строения полиазотистых гетероциклов, в учебном процессе и в реальном секторе экономики.

Для решения задач, поставленных в проекте, используется научный задел, накопленный коллективом по синтезу и изучению химических свойств гетероциклических соединений, опыт работы с изотопномечеными соединениями, а так же результаты, полученные при выполнении первого и второго этапа этого проекта. Так, в работе применяются оригинальные подходы к синтезу исходных аминоказолов и гидразиноазолов, а также конденсированных полиазотистых гетероциклов (азоло[5,1-с][1,2,4]триазинов и азоло[1,5-а]пиримидинов). Используются современные достижения ЯМР-спектроскопии высокого разрешения для исследования строения конденсированных азолоазинов.

В ходе выполнения III этапа проекта был использован следующий инструментарий:

магнитная мешалка IKA MSA Yellow Line; роторный испаритель Heidolph 2 Laborota 4000 – efficient; насос вакуумный 2НВР-5ДМ; УФ-облучатель хроматографический УФС-254/365; масс-спектрометр Varian-MAT-311A; спектрофотометр Cary-50 (Varian), ЯМР-спектрометр BRUKER AVANCE II 400 МГц, укомплектованный широкополосным BBO-F датчиком с дополнительной Z-градиентной катушкой; ЯМР-спектрометр AVANCE 700 фирмы BRUKER, укомплектованный высокочувствительным криодатчиком тройного резонанса (^1H , ^{13}C , ^{15}N) с охлаждаемыми ^1H и ^{13}C катушками (TCI cryoprobe); программное обеспечение Topspin 2.1 (Bruker); программное обеспечение CARA 1.8 (EthZuric), СанПин 2.2.2.1327-03, 2.2.2/2.4.2198-07; Постановление Правительства РФ от 4 мая 2005 г. № 284.

Представлены материалы теоретических и экспериментальных исследований, раскрывающие содержание работ по решению поставленных научно-исследовательских задач (объем 4,6 п.л.), включая:

- схемы и описания методов синтеза производных 1,2,4-триазинов и пиримидинов, меченных изотопом ^{15}N ;
- схемы получения 1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов и тетразоло[1,5-а]пиримидинов, содержащих в своей структуре более одного изотопа ^{15}N ;
- препаративные методики получения изотопномеченных производных тетразоло[1,5-*b*][1,2,4]триазинов, тетразоло[1,5-*a*]пиримидинов и 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинов-7-онов и производных на их основе;
- данные по измерению химических сдвигов в 1D ^{15}N ЯМР спектрах;
- данные 2D ^{15}N - ^1H НМВС ЯМР-экспериментов для ^{15}N меченых азолазинов;
- результаты измерения ^{13}C - ^{15}N КССВ и отнесения сигналов в 1D ^{15}N ЯМР спектрах;
- результаты различных химических превращений и трансформаций ^{15}N -

азинов (перегруппировку Димрота, реакции комплексообразования и алкилирования);

- анализ гетероядерных спин-спиновых констант ^{13}C - ^{15}N , ^{15}N - ^1H и данных спектров 1D ^{15}N ЯМР в установлении продуктов трансформации и механизмов химических превращений конденсированных полиазотистых гетероциклов;

- оценка использования совместного анализа данных спектров 1D ^{15}N ЯМР и гетероспиновых взаимодействий ^{13}C - ^{15}N и ^{15}N - ^1H КССВ для доказательства строения азолазинов и изучения их химических трансформаций и превращений;

В рамках выполнения III этапа проекта:

- исходя из ^{15}N -аминогуанидина и K^{15}NO_2 , разработаны эффективные методы синтеза $[2,3\text{-}^{15}\text{N}_2]$ -5-аминотетразола исходного соединения для получения тетразоло[1,5-*a*]пиримидинов, содержащих две метки в азольном цикле;

- синтезированы замещенные тетразоло[1,5-*a*]пиримидины, содержащие одну или две изотопные метки ^{15}N в азольном цикле;

- предложен метод введения изотопа ^{15}N в азольный фрагмент тетразоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов, исходя из изотопномеченой азотистой кислоты, которая была генерирована из $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ (^{15}N , 98%);

- осуществлена наработка меченых производных тетразоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов и тетразоло[1,5-*a*]пиримидинов, содержащих один или два изотопа ^{15}N в азольном цикле, получено три образца данного класса соединений в количестве 25-40 мг для ЯМР-исследований.

- разработаны методы анализа гетероспиновых взаимодействий ^{15}N - ^1H для доказательства строения азолазинов путем адаптации техники 2D ^{15}N - ^1H НМВС ЯМР-экспериментов, используемых в физико-химических исследованиях пептидов и белков;

- исследована азидо-тетразольная таутомерия в ряду замещенных

тетразоло[1,5-а]пиримидинов с использованием совместного анализа КССВ ^{13}C - ^{15}N и ^{15}N - ^1H ;

- разработаны универсальные методы введения изотопа ^{15}N в азольный фрагмент 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинов;

- на примере образца противовирусного препарата $^{15}\text{N}_3$ -триазавирин продемонстрировано, что анализ КССВ ^{13}C - ^{15}N позволяет соотносить сигналы в 1D ^{15}N ЯМР спектре;

- с использованием данных 1D ^{15}N спектров и анализа КССВ ^{13}C - ^{15}N и ^{15}N - ^1H исследованы особенности химических превращений азолоазинов (прегруппировка Димрота, комплексообразование и реакция алкилирования);

- проведено сравнение данных о строении тетразоло[1,5-а]пиримидинов, полученных на основании КССВ ^{13}C - ^{15}N и результатов рентгеноструктурного анализа немеченых аналогов;

- по итогам научных исследований этого этапа подготовлена статья, которая опубликована в журнале *Известия Академии наук. Серия химическая*;

- результаты третьего этапа проекта были представлены в виде стендового доклада на конференции XIV Молодежной конференции по органической химии.

№ П2444/1 от 15.03.2010, № П2444/2 от 27.07.2010, № П2444/3 от 16.03.2011

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

КССВ – константы спин-спинового взаимодействия;

ССВ – спин-спиновое взаимодействие;

РСА – рентгеноструктурный анализ;

ЯМР – ядерный магнитный резонанс;

HSQC – (Heteronuclear Single Quantum Coherence) гетероядерная корреляционная спектроскопия ЯМР с использованием одноквантовой когерентности;

HMBC – (Heteronuclear Multiple Bond Corelation) гетероядерная корреляционная спектроскопия ЯМР с передачей намагниченности через несколько ковалентных связей;

DMSO – диметилсульфоксид;

DMF – диметилформамид;

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	11
1. АННОТИРОВАННАЯ СПРАВКА О ПРОВЕДЕНИИ ТЕОРЕТИЧЕСКИХ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ НИИР, ПОЛУЧЕННЫХ НА I И II ЭТАПАХ	16
2. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОТЧЕТ О ПРОВЕДЕНИИ ТЕОРЕТИЧЕСКИХ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	19
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ТЕОРЕТИЧЕСКИХ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	21
3.1. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ 2D ^1H - ^{15}N КОРРЕЛЯЦИОННЫХ ЯМР-ЭКСПЕРИМЕНТОВ И СПЕКТРОВ 1D ^{15}N СОВМЕСТНО С КССВ ^{13}C - ^{15}N , КАК ПОДХОД ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ ТЕТРАЗОЛО[1,5- <i>a</i>]ПИРИМИДИНОВ И ТЕТРАЗОЛО[5,1- <i>c</i>]ТРИАЗИНОВ	21
3.2. КОНСТАНТЫ ССВ ^{13}C - ^{15}N В ИССЛЕДОВАНИИ СТРОЕНИЯ ТЕТРАЗОЛО[1,5- <i>a</i>]ПИРИМИДИНОВ	39
3.3. СИНТЕЗ ИЗОТОПНОМЕЧЕНОГО ПРОТИВОВИРУСНОГО ПРЕПАРАТА [$^2\text{H}_3$, $^{15}\text{N}_3$]-ТРИАЗАВИРИН	42
3.4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ^{15}N МЕЧЕНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ИЗУЧЕНИИ ОСОБЕННОСТЕЙ ХИМИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ ПОЛИАЗОТИСТЫХ КОНДЕНСИРОВАННЫХ ГЕТЕРОЦИКЛОВ	47
3.5. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	55
4. ОТЧЕТ ОБ ОБОБЩЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ	63
4.1. АНАЛИЗ КССВ ^{13}C - ^{15}N , КАК СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД В ИССЛЕДОВАНИИ СТРОЕНИЯ И ПРЕВРАЩЕНИИ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ГЕТЕРОЦИКЛОВ	63
4.2. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ НИИР В РЕАЛЬНОМ СЕКТОРЕ ЭКОНОМИКИ	65
5. ПУБЛИКАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НИИР	66
5.1. ЗАКЛЮЧЕНИЕ ЭКСПЕРТНОЙ КОМИССИИ ПО ОТКРЫТОМУ ОПУБЛИКОВАНИЮ	66
5.2. КОПИИ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ ВАК ИЛИ ЗАРУБЕЖНОМ ЖУРНАЛЕ С ОБЯЗАТЕЛЬНОЙ ССЫЛКОЙ НА ПРОВЕДЕНИЕ НИИР В РАМКАХ РЕАЛИЗАЦИИ ФЦП «НАУЧНЫЕ И НАУЧНО-ПЕДАГОГИЧЕСКИЕ КАДРЫ ИННОВАЦИОННОЙ РОССИИ» НА 2009-2013 ГОДЫ	67
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	71
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	73

ВВЕДЕНИЕ

Анализ литературных данных показал, что использование ^{15}N изотопномеченных соединений является одним из инструментов исследования механизмов химических реакций и изучения особенностей строения полиазотистых гетероциклов.

Введение атома ^{15}N в молекулу диметилдигидро-1,2,4,5-тетразин-3,6-дикарбоксилата **1** позволило на основании данных химических сдвигов меченых атомов азота исследовать прототропную таутомерию [1]. При этом установлено, что в растворе данное соединений существует в виде 1,2- и 1,4-дигидротаутомеров, структура **1*А** и **2*В**, соответственно. (Схема 1).

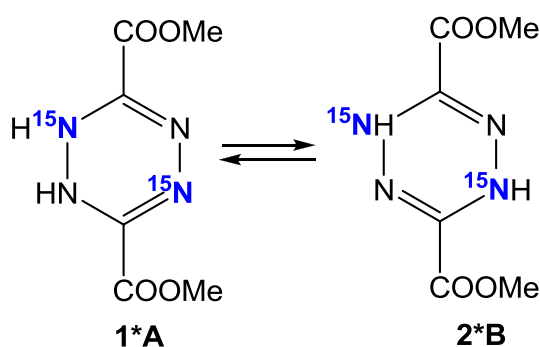


Схема 1

Применение обогащенной изотопом ^{15}N соли 2,3-диамина изохинолина **3*** при взаимодействии с ацетальдегидом в основных условиях, в присутствии 1,8-диазацикло[5.4.0]ундец-7-ена, позволило установить, что меченый атом азота в продукте реакции **4*** оказывается в боковом заместителе. Это заключение было сделано на основании сравнения химических сдвигов в 1D ^{15}N ЯМР спектров соединений **3*** и **4***, а также результатов 2D корреляционных экспериментов ^1H - ^{15}N HMQC [2].

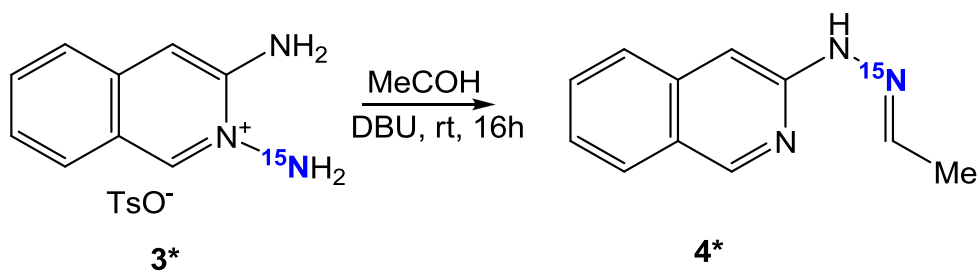


Схема 2

Полученные данные позволили предположить, что путь превращения соединения **3*** в гетероцикл **4*** протекает с участием перегруппировки Димрота и может быть представлен в виде схемы 3.

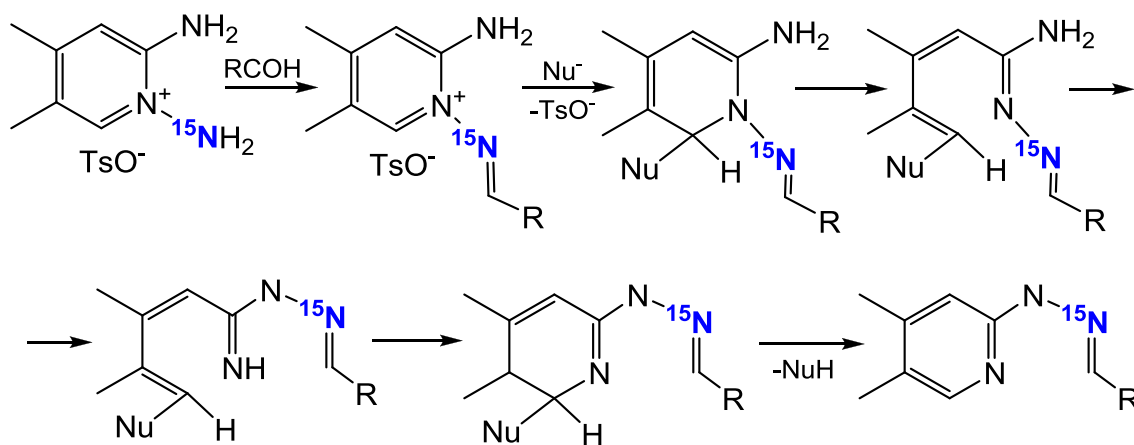


Схема 3

Включение атома ^{15}N в структуру **6*AAA** с несколькими азидогруппами в дальнейшем позволило подтвердить строение соединения **7*AA**, содержащего оксазольный аннелированный фрагмент, а также исследовать азидо-тетразольную таутомерию на основании химических сдвигов меченых атомов в 1D ^{15}N ЯМР (Схема 4) [3]. В данной работе установлено, что соединение **7*** существует в растворе как в виде азидного изомера **7*AA**, так и в тетразольной форме **7*TA**.

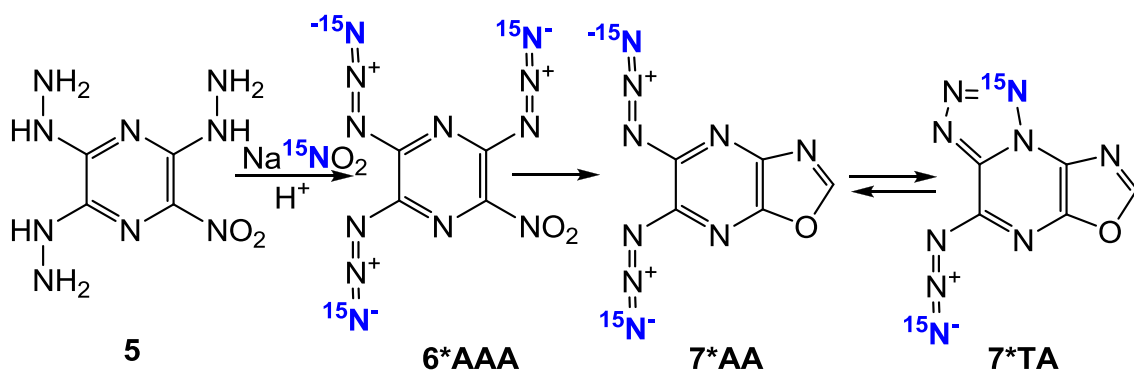


Схема 4

В этом случае рассуждения авторы построены на разнице химических сдвигов сигналов азидогруппы **7*AA** и тетразольного изомера **7*TA**. Однако

в этом случае авторы не учитывают возможности циклизации с участием второй азидогруппы.

В тоже время, использование анализа КССВ ^{13}C - ^{15}N позволяет однозначно устанавливать строение азотсодержащих конденсированных гетероциклов. Так, селективное ведение изотопной метки ^{15}N в азид **9*А**, позволило установить, что продуктом спонтанной циклизации данного соединения является полиазотистый гетероцикл **9*Т** (Схема 5) [4].

При этом способ аннелирования азольного и азинового циклов [1,5-*b*] установлен на основании анализа констант спин-спинового взаимодействия ^{13}C - ^{15}N сигналов атомов C2 и C5 в углеродном спектре. Необходимо отметить, что альтернативная структура должна характеризоваться наличием трех гетероспиновых КССВ ^{13}C - ^{15}N . Следует подчеркнуть, что ранее продукту циклизации немеченого азида **9*А** приписана структура **9Т'**, в которой тетразольный и азиновый циклы аннелированы по типу [5,1-*c*] [5]. Таким образом, было показано, что анализ констант ССВ ^{13}C - ^{15}N является мощным инструментом в определении строения конденсированных азолазинов.

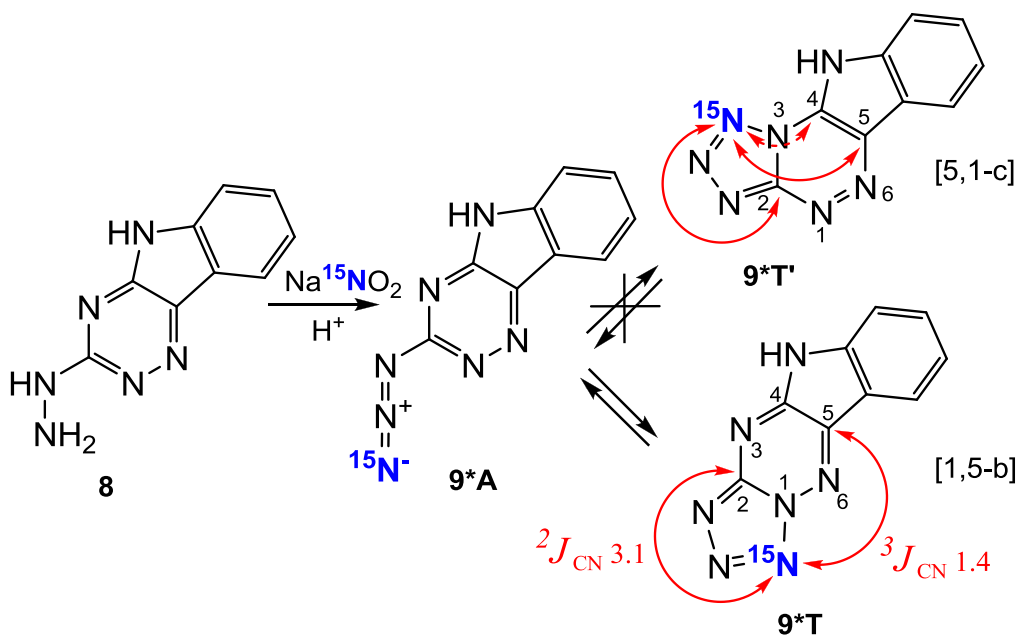


Схема 5

Успех этого подхода связан с тем, что селективное введение атома ^{15}N в структуру азотсодержащих гетероциклов, приводит к появлению

дополнительных уникальных характеристик для атомов углерода, находящихся в районе двух или трех ковалентных связей от изотопной метки, в 1D ^{13}C ЯМР спектрах. Появление новых гетероспиновых взаимодействий ^{13}C - ^{15}N значительно расширяет возможности ЯМР спектроскопии в исследованиях особенностей структуры и путей превращения полиазотистых аннелированных гетероциклов.

Важность этого подхода обусловлена и тем фактом, что традиционные 1D (^1H , ^{13}C , ^{15}N) и 2D ЯМР-эксперименты (^1H - ^{13}C HMBС и ^1H - ^{13}C HSQC) зачастую являются малоинформативными в установлении строения конденсированных азотсодержащих гетероциклов и доказательства строения продуктов их химических трансформаций из-за низкого содержания атомов водорода и углерода в структуре данного класса соединений.

Эффективность использования КССВ ^{13}C - ^{15}N продемонстрирована на примере установления строения продуктов адамантилирования 6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов **10*** [6,7].

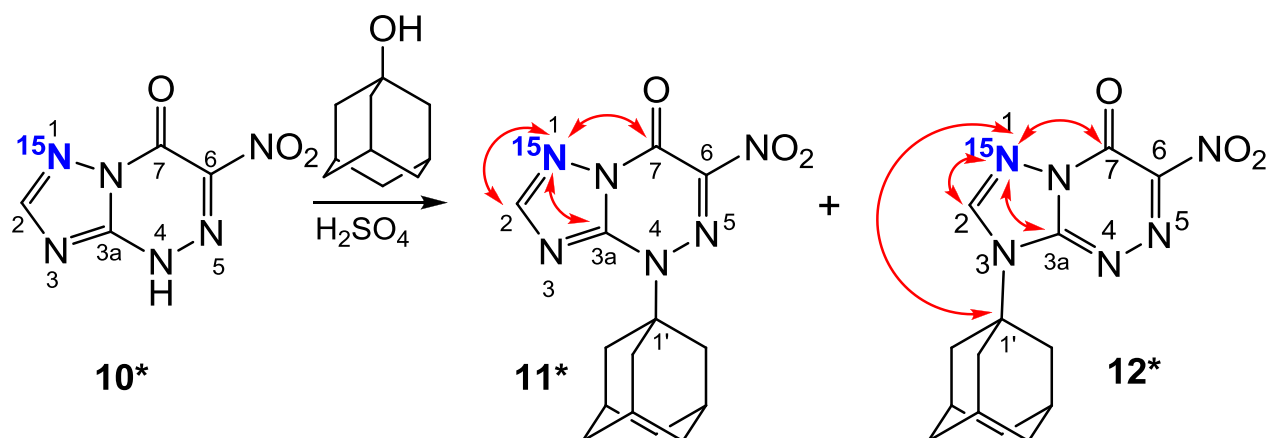


Схема 6

Так, для продукта алкилирования по атому N4 соединения **11*** было зафиксировано три J_{CN} -константы у сигналов атомов углерода триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинового фрагмента (Схема 6). Дополнительное гетероспиновое взаимодействие фиксировалось у алкилпроизводного **12*** за счет появления КССВ ^{13}C - ^{15}N у атома C1'-адамантильного фрагмента ($^3J_{\text{N-C1'}}$ 0.5 Гц). Величина константы ССВ полностью подтверждает структуру продукта

алкилирования соединения **12***, поскольку в случае образования продукта адамантилирования по атому $^{15}\text{N1}$ у сигнала атома C1' в углеродном спектре наблюдалась бы прямая КССВ ^{13}C - ^{15}N 10-11 Гц [8].

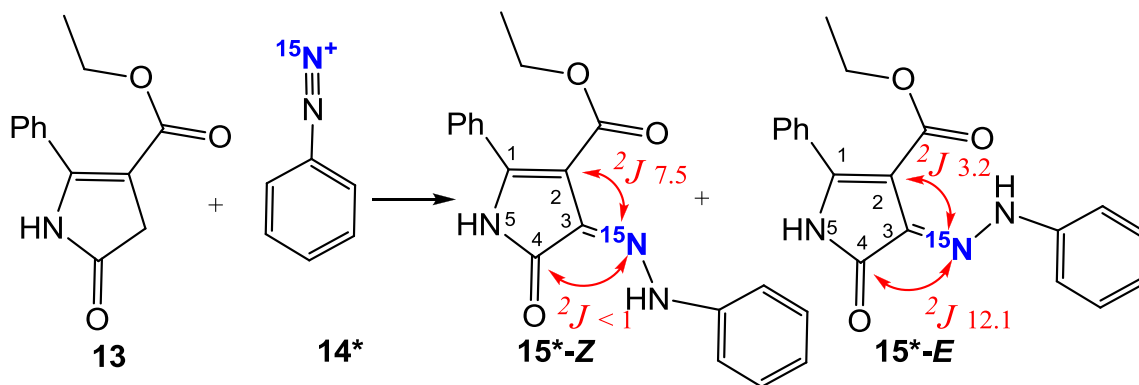


Схема 7

По величине констант спин-спинового взаимодействия ^{13}C - ^{15}N в спектре 1D ^{13}C ЯМР удалось определить конфигурацию продуктов азосочетания пиролинона **13** с солью диазония **14*** (Схема 7) [9]. Так, структуру Z-конформера **15*-Z** подтверждают константы ССВ $J_{\text{N-C2}}$ 7.5 Гц и $J_{\text{N-C4}} \approx 1$ Гц. Образование альтернативного геометрического изомера **15*-E** приводит к тому, что константа спин-спинового взаимодействия ^{13}C - ^{15}N у атома C4 значительно больше, чем у сигнала C2 ($J_{\text{N-C2}}$ 7.5 Гц и $J_{\text{N-C4}} \approx 1$ Гц, соответственно).

Таким образом, анализ КССВ ^{13}C - ^{15}N является перспективным современным подходом, требующим дальнейшего развития. Одним из направлений является разработка разнообразных методов использования J_{CN} -констант совместно с другими подходами (2D ^{15}N - ^1H НМВС экспериментами, количественным анализом $^nJ_{\text{CN}}$ -констант и 1D ^{15}N ЯМР спектроскопией).

1. АННОТИРОВАННАЯ СПРАВКА О ПРОВЕДЕНИИ ТЕОРЕТИЧЕСКИХ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПНИР, ПОЛУЧЕННЫХ НА I И II ЭТАПАХ

При выполнении первого этапа государственного проекта был осуществлен аналитический обзор литературных данных по синтезу азоло[5,1-с][1,2,4]триазинов и азоло[1,5-а]пиримидинов, рассмотрены проблемы доказательства строения данных гетероциклических систем, проанализированы результаты использования гетероядерных КССВ для доказательства строения полиазотистых гетероциклов. Это позволило определить основные направления исследований и разработать план проведения экспериментальных и теоретических исследований. Исходя из ^{15}N меченого нитрата калия, создан простой метод получения K^{15}NO_2 , реагента для синтеза меченой азотистой кислоты. С использованием обогащенного нитрита натрия предложен метод введения изотопа ^{15}N в азольный фрагмент незамещенного тетразоло[1,5-с]пиримидина. На примере незамещенного тетразоло[1,5-с]пиримидина показано, что КССВ ^{13}C - ^{15}N измеренные методами деконволюции спектральных линий в 1D ^{13}C ЯМР спектрах с использованием амплитудно-модулированного 1D ^{13}C спинного эха и селективной инверсии намагниченности ^{15}N ядер могут быть применены для определения структуры конденсированных азолоазинов.

Основными достижениями второго этапа является синтез изотопномеченых полиазотистых гетероциклов, содержащих изотоп ^{15}N в азольном и азиновом циклах. В результате были получены меченные изотопом ^{15}N тетразоло[1,5-*b*][1,2,4]триазины, тетразоло[1,5-*a*]пиримидины и 1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины. Для аннелированных производных тетразола было использовано два метода. Первый – взаимодействие гетарилгидразинов с H^{15}NO_2 , генерированной из меченого нитрита калия/натрия в кислых условиях. Этот подход был использован для синтеза незамещенного тетразоло[1,5-*a*]пиримидина на первом этапе. Второй подход был основан, на использовании меченого аминогуанидина, который является исходным соединением для получения ^{15}N -аминоазолов – основных синтонов

для построения азолазинов путем аннелирования 1,2,4-триазинового или пиримидинового циклов к азольному. Особенностью данного подхода при синтезе тетразольных производных 1,2,4-триазинов и пиримидинов является образование смеси, состоящей из двух изотопомеров. На этом же этапе нами были разработаны методы включения изотопов ^{15}N в азольный и в азиновый циклы 1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов с использованием $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ и ^{15}N -аминогуанидина. В результате был получен противовирусный препарат «триазавирин» (натриевая соль 6-нитро-2-метилтио-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она) с двумя метками ^{15}N . Благодаря разработанным эффективным методам введения изотопа ^{15}N было наработано шесть образцов в количестве 25-200 мг для ЯМР-исследований (измерения гетероядерных констант и химических сдвигов меченых атомов азота).

Для количественного измерения КССВ ^{13}C - ^{15}N в конденсированных азолазинах разработано два способа измерения. Первая методика основывается на деконволюции спектральных линий в 1D ^{13}C ЯМР спектрах исследуемых соединений. Деконволюция проводилась в программе Mathematica (Wolfram research). Для увеличения точности измерения КССВ одновременно обрабатывались несколько 1D ^{13}C ЯМР спектров, накопленных без развязки от ядер ^{15}N и с селективной развязкой от ядер ^{15}N (двух спектров в случае образования смеси изотопомеров). Второй подход, использованный для измерения гетероядерных констант спин-спинового взаимодействия ^{13}C - ^{15}N , был основан на методе амплитудно-модулированного спинового эха. Для измерения КССВ были использованы 1D ^{13}C спин-эхо эксперименты с селективной инверсией ядер ^{15}N в спин-эхо последовательности.

На основании количественного измерения КССВ ^{13}C - ^{15}N разработан метод доказательства способа аннелирования азольного и азинового циклов в тетразола[1,5-*b*][1,2,4]триазилах и 1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазилах. Установлено, что измерение гетероядерных констант спин-спинового взаимодействия ^{13}C - ^{15}N позволяет отнести сигналы меченых атомов азота в спектре ^{15}N ЯМР и подтвердить положение изотопной метки ^{15}N . Разработан

новый эффективный метод исследования азидо-тетразольного равновесия на основании комплексного анализа данных КССВ ^{13}C - ^{15}N и химических сдвигов меченых атомов азота. Показаны преимущества нового подхода по сравнению с методом рентгеноструктурного анализа. Проведена экспертиза о возможности опубликования полученных результатов в открытой печати, подготовлена статья, которая опубликована в журнале *The Journal of Organic Chemistry*.

2. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОТЧЕТ О ПРОВЕДЕНИИ ТЕОРЕТИЧЕСКИХ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

При выполнении III этапа проекта предложен метод введения изотопа ^{15}N в азольный цикл в тетразоло[5,1-с][1,2,4]триазинов и 5-,7-замещенных тетразоло[1,5-а]пиримидинов, исходя из соответствующего гетарилгидразина и обогащенного нитрита натрия. Для производных тетразоло[1,5-а]пиримидинов предложен метод включения двух изотопов ^{15}N в азольный фрагмент. В этом случае в качестве исходного донора изотопов, нами использован [2,3- ^{15}N]-5-аминотетразол. Кроме того, осуществлен синтез изотопномеченых 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинов на основе [2- ^{15}N]-5-амино-1,2,4-триазола и реализована схема получения препарата триазавирин, содержащего три атома ^{15}N и три изотопа дейтерия. Изотопномеченый препарат триазавирина представляет интерес с точки зрения исследования особенностей метаболизма и фармакокинетики.

Показано на примере тетразоло[5,1-с][1,2,4]триазинов и тетразоло[1,5-а]пиримидинов, что совместный анализ КССВ ^{13}C - ^{15}N и ^{15}N - ^1H является новым подходом для установления строения конденсированных полиазотистых гетероциклов. Для измерения $^nJ_{\text{CN}}$ -констант был использованы два метода. Первый подход основывается на деконволюции спектральных линий в 1D ^{13}C ЯМР спектрах исследуемых соединений. Деконволюция проводилась в программе Mathematica (Wolfram research). Для увеличения точности измерения КССВ одновременно обрабатывались несколько 1D ^{13}C ЯМР спектров, накопленных без развязки от ядер ^{15}N и с селективной развязкой от ядер ^{15}N (двух спектров в случае присутствия нескольких изотопных меток в структуре азолазина или двух изотопных изомеров). Второй подход, использованный для измерения гетероядерных констант спин-спинового взаимодействия ^{13}C - ^{15}N , был основан на методе амплитудно-модулированного спинового эха. Для измерения КССВ были использованы 1D ^{13}C спин-эхо эксперименты с селективной инверсией ядер ^{15}N . Анализ гетероспиновых взаимодействий ^{15}N - ^1H проводился на

основании 2D ^{15}N - ^1H HMBC ЯМР-экспериментов. Для количественной оценки КССВ ^{15}N - ^1H был разработан метод спин-эхо с селективной инверсией намагниченности ядра ^{15}N , путем адаптации техники ЯМР-экспериментов, используемой в физико-химических подходах при исследовании структуры пептидов и белков. Использование этого метода для количественного измерения $^nJ_{\text{CN}}$ -констант стало возможным благодаря селективному введению изотопов ^{15}N в структуру азолазинов.

При выполнении этого этапа проекта продемонстрировано, что анализ гетероспиновых констант ^{13}C - ^{15}N и ^{15}N - ^1H является эффективным инструментом исследования особенностей реакций азолазинов. На основании $^1J_{\text{NH}}$ -констант исследована реакция алкилирования 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинов (2-ацетоксиэтокси)метилацетатом в присутствии триметилсилилтрифторметисульфоната. Показано, что продукт алкилирования по триазольному циклу является продуктом кинетического контроля, а продукт, содержащий алкильный заместитель в пиримидиновом цикле, контролируется термодинамическими условиями. Кроме того установлено, что 1D ^{15}N спектры в случае производных [5- ^{15}N]-6-пиридил-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов могут выступать в качестве критерия комплексообразования данного класса соединений.

Использование констант-спин-спинового взаимодействия ^{13}C - ^{15}N и данных 1D ^{15}N ЯМР спектроскопии позволили впервые обнаружить перегруппировку Димрота в ряду тетразоло[1,5-а]пиримидинов. Благодаря анализу J_{CN} -констант удалось установить, что 3-азидо-1,2,4-триазины способны циклизироваться в тетразоло-1,2,4-триазины со способом аннелирования тетразольного и триазинового циклов [5,1-с].

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ТЕОРЕТИЧЕСКИХ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ 2D ^1H - ^{15}N КОРРЕЛЯЦИОННЫХ ЯМР-ЭКСПЕРИМЕНТОВ И СПЕКТРОВ 1D ^{15}N СОВМЕСТНО С КССВ ^{13}C - ^{15}N , КАК ПОДХОД ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ ТЕТРАЗОЛО[1,5-*a*]ПИРИМИДИНОВ И ТЕТРАЗОЛО[5,1-*c*]ТРИАЗИНОВ

При выполнении первого этапа данного проекта было установлено, что введение изотопной метки ^{15}N в азольный цикл незамещенного тетразоло[1,5-*a*]пиримидина **17**, исходя из 2-гидразинопиримидина **16**, позволяет на основании анализа констант спин-спинового взаимодействия ^{13}C - ^{15}N исследовать азидо-тетразольную таутомерию. При этом необходимо отметить, что при образовании смеси изотопомеров **17*а** и **17*б** данный вид кольчато-цепной таутомерии был изучен без особых затруднений (Схема 8).

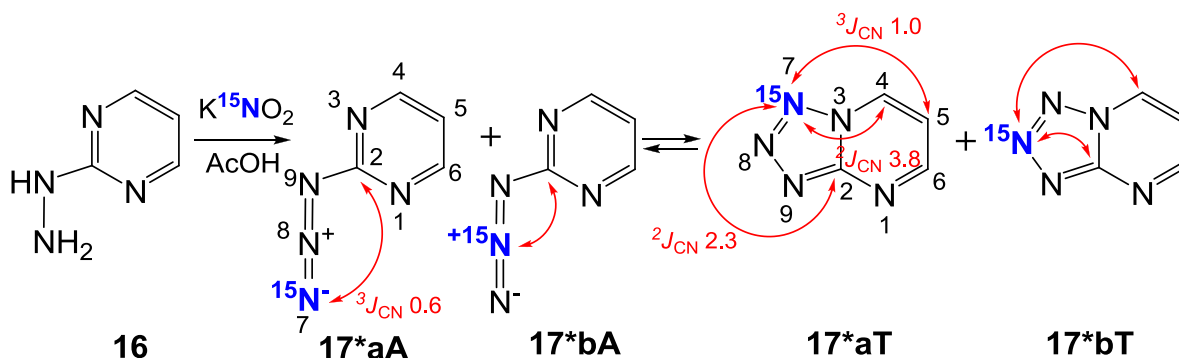


Схема 8

Так, в случае азидоформ **17*aA** и **17*bA** в углеродном спектре присутствует единственная J_{CN} -константа для сигнала углерода C2. В продуктах циклизации азидогруппы **17*aT** и **17*bT** наблюдаются дополнительные КССВ ^{13}C - ^{15}N у сигналов атомов углерода пиримидинового фрагмента. Таким образом, анализ гетероспиновых взаимодействий ^{13}C - ^{15}N позволяет однозначно фиксировать переход открытого изомера в циклический при изучении азидо-тетразольного равновесия.

Появление заместителей R_1 и R_2 в положениях 4 и 6 азинового цикла в 2-

азидопиримидинах **IA** приводит к тому, что возможно образование двух тетразольных форм **IT** и **IT'** (Схема 9). Одним из способов включения стабильного изотопа ^{15}N в структуру азида **IA** является взаимодействие меченого нитрита калия/натрия с соответствующим гетарилгидразином в кислой среде.

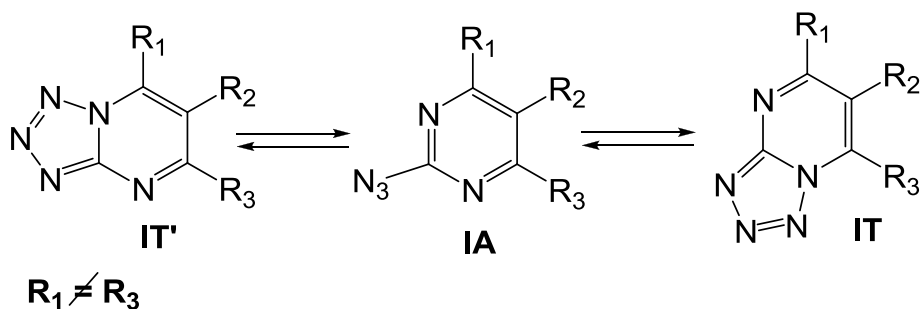


Схема 9

Обработка гидразина **18** нитритом калия, обогащенным изотопом ^{15}N (86 %), привела к азиду **19*A**, который способен образовывать две изомерные циклические формы **19*T** и **19*T'**, отличающиеся расположением метильной и карбонильной групп в пиримидиновом цикле.

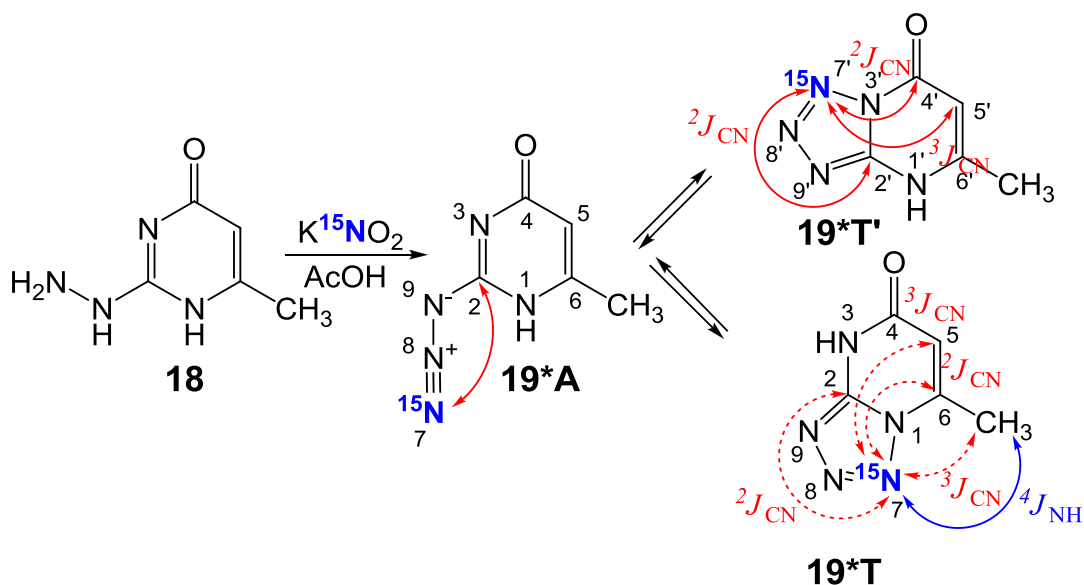


Схема 10. КССВ ^{13}C - ^{15}N зафиксированы только у соединения **19*T'**

Анализ продукта взаимодействия гидразина **18** с K^{15}NO_2 показал, что образующийся продукт находится в растворе DMSO-d_6 в виде двух тетразольных форма **19*T** и **19*T'**. При этом по данным протонного спектра соотношение изомеров **19*T** и **19*T'** сразу после растворения было

зафиксировано как 3.5 : 1 (Рис. 1А). Через двенадцать дней соотношение двух тетразольных форм составило 1 : 1 (Рис 2 А).

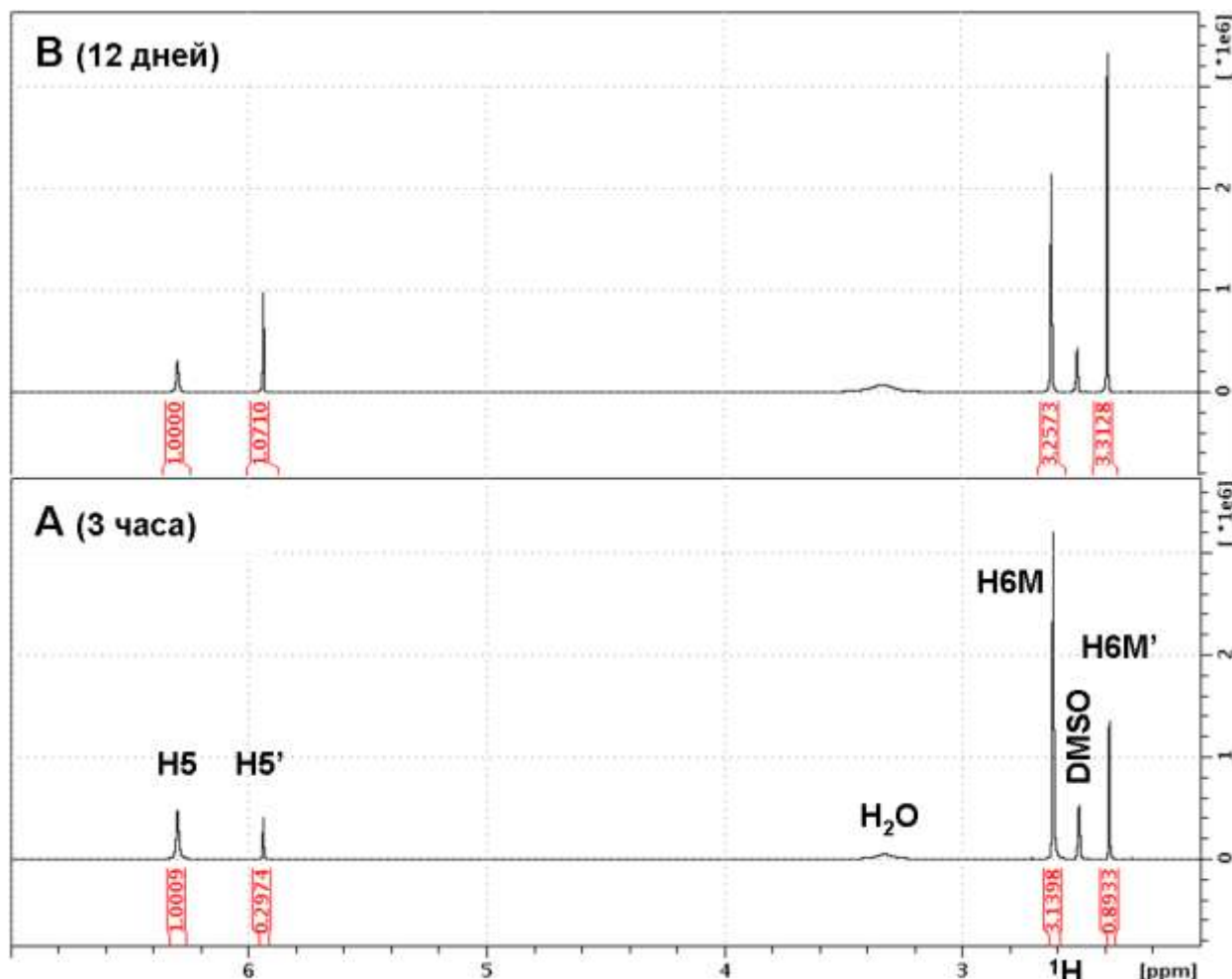


Рис. 1. Фрагменты спектров 1D ^1H ЯМР соединения **19*T** через 3 часа (А) и 12 дней (В) после растворения. Показано отнесение сигналов для двух тетразольных форм (**T** и **T'**) соединения (DMSO, 30 °C, BRUKER AVANCE 700 МГц)

Существование двух тетразольных форм однозначно подтверждают значения химических сдвигов меченых атомов азота, которые регистрировались в области $344 \div 347$ м.д. (Рис. 2, таблица 1). Однако данные спектров 1D ^1H и ^{15}N ЯМР не позволяют сделать окончательное заключение о строении бициклов **19*T** и **19*T'**. Вывод о структуре продукта **19*T'** был сделан на основании констант ССВ ^{13}C - ^{15}N , которые регистрировались у сигналов C2, C5, C6 в 1D ^{13}C ЯМР спектре. Измерение КССВ ^{13}C - ^{15}N

проведено прямым методом и с помощью экспериментов «спин-эхо». В случае соединения **19*Т** спин-спиновое взаимодействие ^{13}C - ^{15}N не удалось зафиксировать из-за уширения сигналов атомов углерода. Углеродный спектр смеси тетразольных форм представлен на рисунке 3.

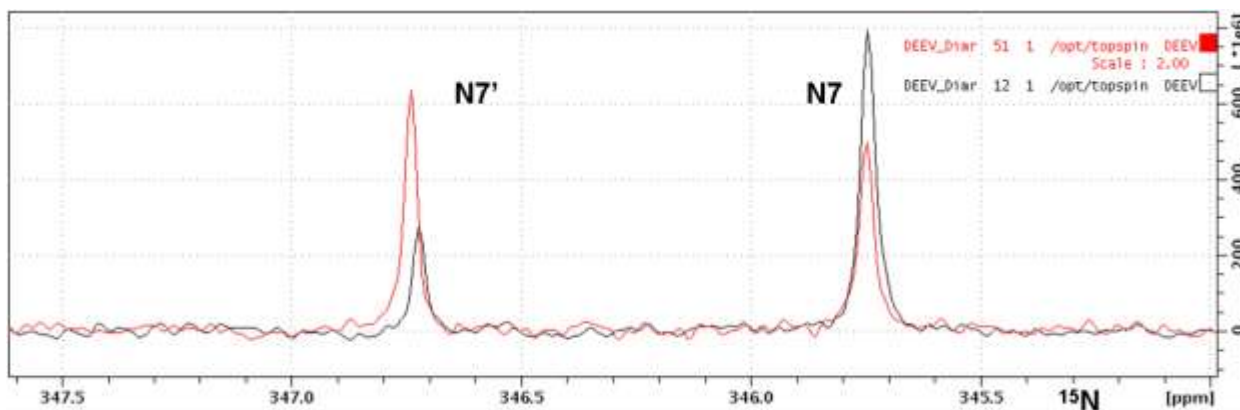


Рис. 2. Фрагменты спектров 1D ^{15}N ЯМР соединения **19Т** через 3 часа (черный) и 12 дней (красный) после растворения. Показано отнесение сигналов для двух тетразольных форм (**Т** и **Т'**) соединения (DMSO, 30 °С, BRUKER AVANCE 700 МГц).

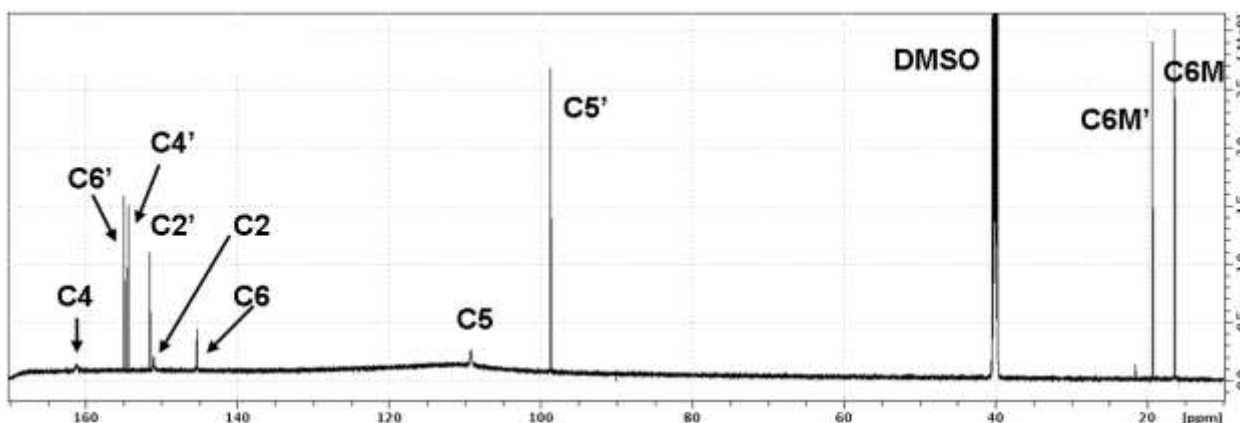


Рис. 3. Фрагмент спектра 1D ^{13}C ЯМР смеси соединений **19Т** и **19Т'** с развязкой от ядер ^{15}N . Спектр измерен через 12 дней после растворения. Показано отнесение сигналов для двух тетразольных тетразольных форм (**Т** и **Т'**) соединения. (DMSO, 30 °С, BRUKER AVANCE 700 МГц).

Строение тетразольного **19*Т** изомера, образовавшегося при спонтанной циклизации азида **19*А**, было подтверждено данными 2D ^{15}N - ^1H HMBС

корреляционного спектра, в котором присутствовал кросс-пик между сигналами $^{15}\text{N}7$ и протонами метильной группы (Рис. 4). Для структуры **19*Т'** зафиксирован кросс пик между меченым сигналом азота и протоном Н5.

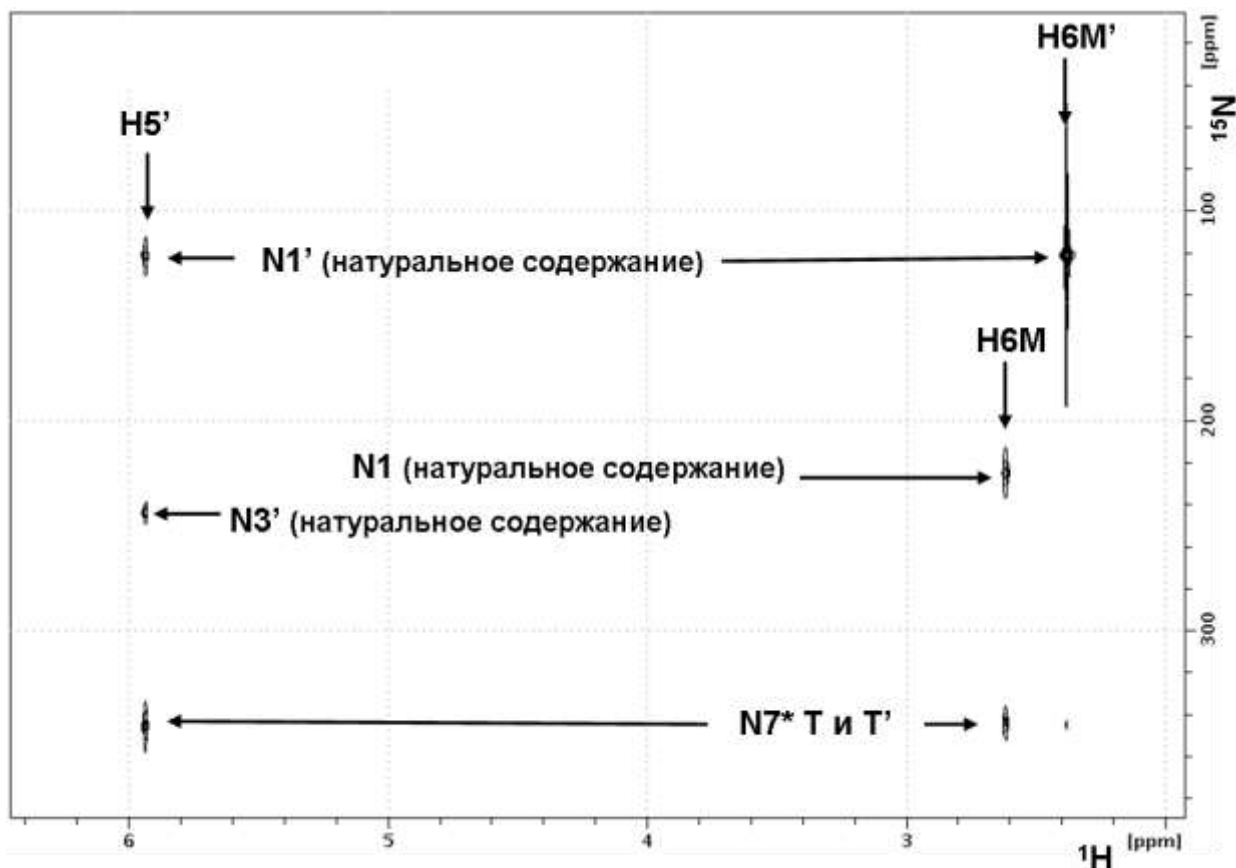


Рис. 4. Фрагмент 2D ^{15}N -HMBC ЯМР спектра смеси соединений **19*Т** и **19*Т'**. Показано отнесение сигналов для двух тетразольных форм (**Т** и **Т'**) соединения. Сигналы изотопнообогащенного атома азота N7 отмечены звездочкой. В 2D ^{15}N -HMBC спектре на натуральном содержании ^{15}N также наблюдаются ядра N1', N3' и N1 (DMSO, 30 °C, BRUKER AVANCE 700 МГц)

Таким образом, 2D ^{15}N - ^1H HMBC ЯМР-эксперименты могут выступать, как дополнительный критерий к анализу J_{CN} -констант и использоваться с ним в комбинации.

Очевидно, что изомеризация соединений **19*Т** и **19*Т'** в растворе DMSO-d₆ протекает, через азид **19*А**, однако сигналы открытой формы в спектрах ¹H, ¹³C и ¹⁵N зафиксированы не были.

Для оценки преимуществ и эффективности комбинированного подхода, который включает анализ КССВ ¹³C-¹⁵N и 2D ¹⁵N-¹H HMQC спектров, был проведен рентгеноструктурный анализ продукта взаимодействия 2-гидразинопиримидина с немеченой азотистой кислотой, полученной из KNO₂ в кислых условиях (Схема 11).

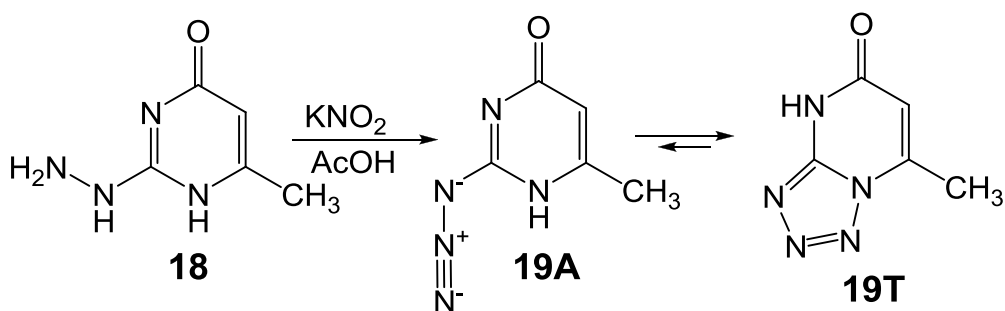


Схема 11

Было установлено, что в кристаллах соединение **19** существует в циклической форме **Т** (Рис. 5), что соответствует данным, полученным при анализе гетероспинового взаимодействия ¹³C-¹⁵N и 2D ¹⁵N-¹H HMBС спектра, записанного в растворе DMSO-d₆.

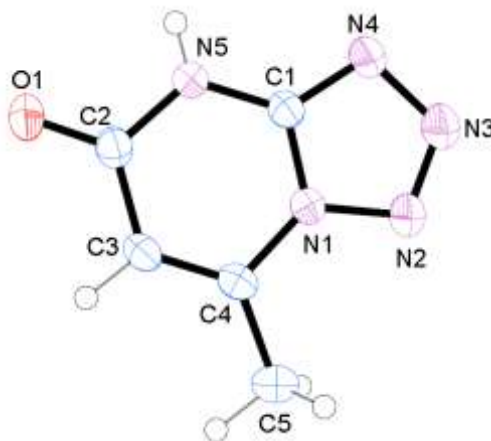


Рис. 5. Молекулярная структура соединения **19Т**

Подобное поведение характерно для производных 3-азидо-1,2,4-триазинов **IIА** (Схема 5). В этом случае 3-азидо-1,2,4-триазины **IIА** способны превращается в структуры **IIТ** со способом аннелирования азольного и

азиновых циклов [1,5-*b*], так и в соединения **IIТ'**, которые относятся к бициклическим системам, конденсированным по способу [5,1-*c*] (Схема 11).

Исследования, которые проведены нами при выполнении второго этапа этого проекта, а также литературные данные показывают, что в большинстве случаев производные 3-азидо-1,2,4-триазинов **IIА** превращаются в тетразольные изомеры **IIТ**.

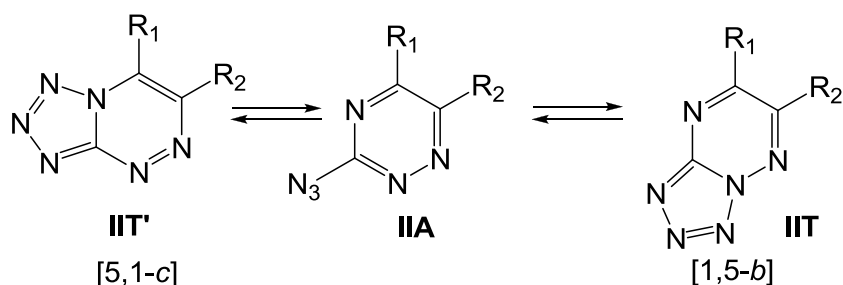


Схема 11

В литературе описана единственная работа, в которой доказывается образование структуры **Т'** (Схема 12) [10]. Для определения способа аннелирования азидогруппы в бензотриазине **20А**, были привлечены методы масс-спектрометрии и ИК-спектроскопии. Однако эти методы трудно назвать совершенными и вопрос о пути аннелирования тетразольного цикла к 1,2,4-триазиновому фрагменту остается открытым.

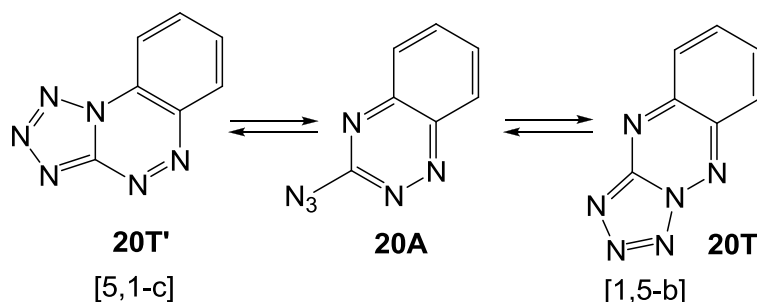


Схема 12

Ранее, при реализации данного проекта, нами был предложен метод включения изотопа ^{15}N в азидную группу в структуру **20*А** с использованием ^{15}N нитрата натрия (степень обогащения 98%) (Схема 13). При выполнении 3 этапа обнаружено по данным спектра 1D ^1H ЯМР, что в растворе DMSO-d_6

для данного образца регистрируется три изомерные формы **20*А**, **20*Т** и **20*Т'**, в соотношении 1:1.5:10 (Рис 6).

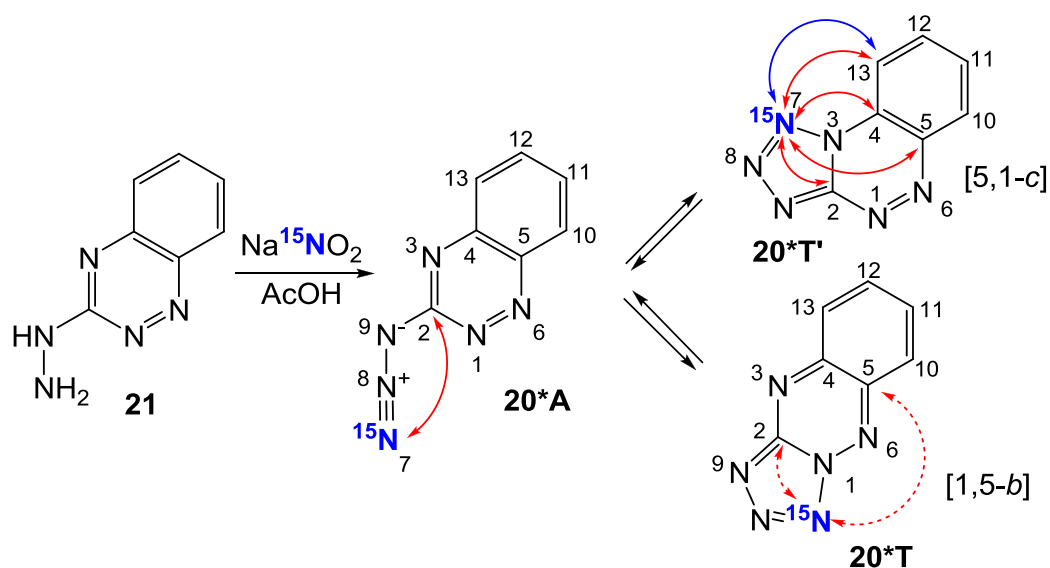


Схема 13

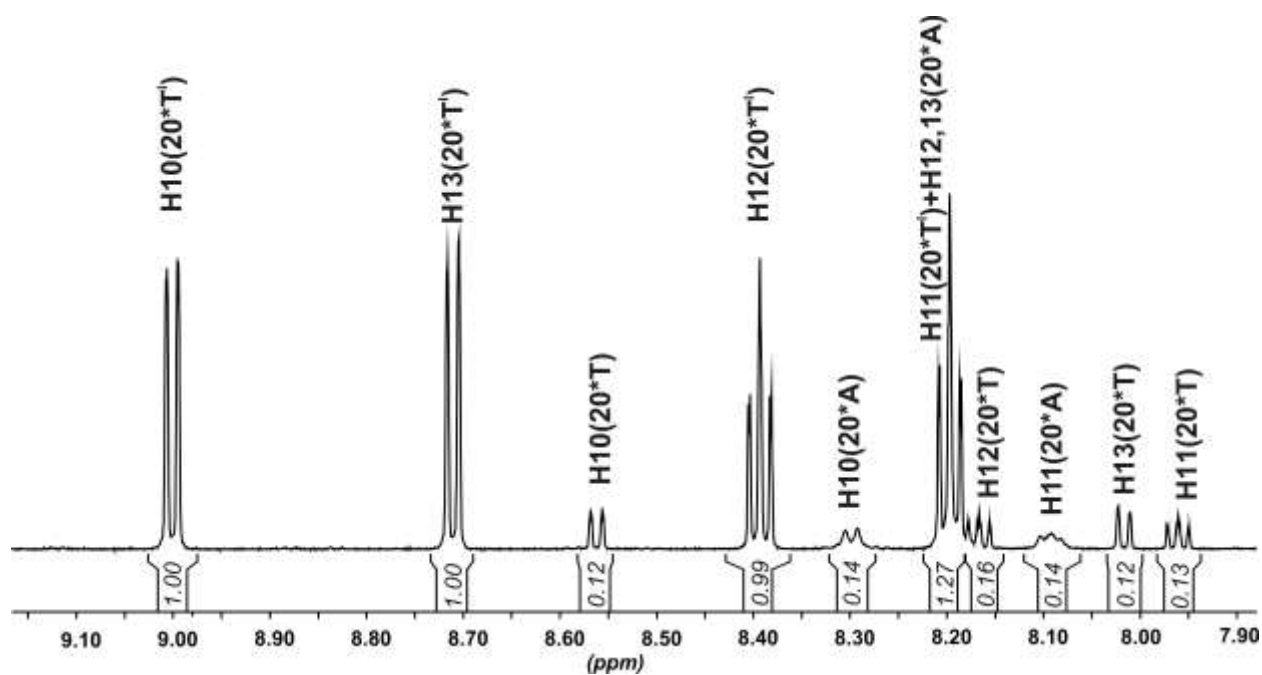


Рис. 6. Спектр 1D ^1H ЯМР смеси соединений **20*А**, **20*Т** и **20*Т'** (DMSO, 43 °C, BRUKER AVANCE 700 МГц)

Строение основного изомера **20*Т'** было установлено на основании измерения КССВ ^{13}C - ^{15}N в спектре 1D ^{13}C ЯМР смеси (Рис 7). Так, спин-

спиновое взаимодействие ^{13}C - ^{15}N наблюдалось у сигналов атомов углерода C2, C4, C5 и C13, что соответствует способу аннелирования азольного и азинового цикла [5,1-с]. Определить константы ССВ ^{13}C - ^{15}N у минорных форм не представлялось возможным из-за их низкой концентрации в растворе DMSO- d_6 . Однако, в случае полициклической структуры **20*Т**, конденсированной по способу [1,5-*b*], должны наблюдаться J_{CN} -константы у сигналов C2 и C5, ряд сигналов азидоформы должен характеризоваться единственной константой ^{13}C - ^{15}N у атома C2.

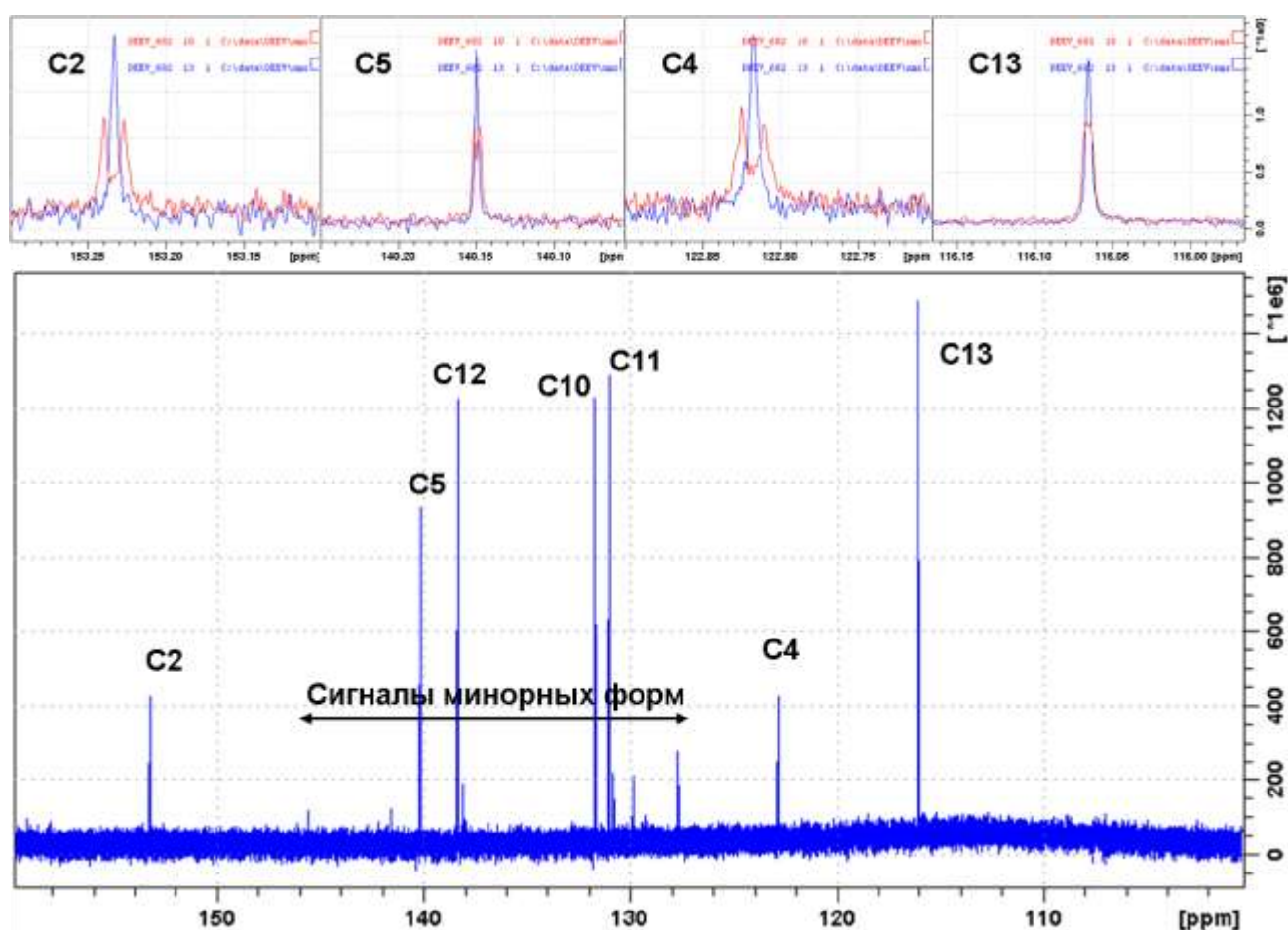


Рис. 7. Фрагмент спектра 1D ^{13}C ЯМР соединения **20*Т'** с развязкой от ядер ^{15}N . Показано отнесение сигналов соединения **20*Т'** и дополнительные сигналы от минорных (азидной **20*А** и тетразольной **20*Т**) форм. Структура и интенсивность сигналов углеродов C2, C4, C5, C13 тетразола **20*Т'** в 1D ^{13}C спектрах с развязкой/без развязки от ядер ^{15}N (DMSO, 43 °C, BRUKER AVANCE 700 МГц)

В тоже время, в углеродном спектре присутствовал ряд дополнительных сигналов, соответствующий другому изомеру. При этом нам не удалось зафиксировать сигнал атома C2, а остальные сигналы не демонстрировали расщеплений связанных с гетероспиновым взаимодействием ^{13}C - ^{15}N . На основании этих данных можно предположить, что волновые сигналы в углеродном спектре принадлежат азидоформе **20*А**.

Наличие в смеси двух других изомеров подтверждает присутствие двух синглетов небольшой интенсивности по сравнению с сигналом $^{15}\text{N7}$ соединения **20*T'**, сдвиги которых соответствуют азидоформе **20*А** и тетразольному изомеру **20*T** (Рис. 8).

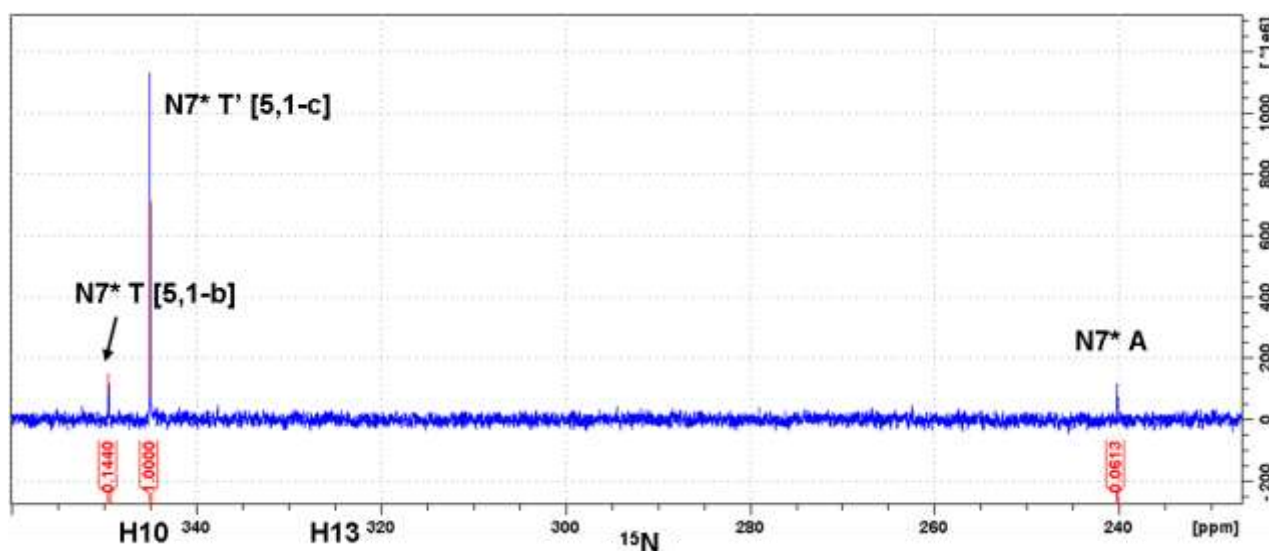


Рис. 8. Спектр 1D ^{15}N смеси соединений **20*А**, **20*T** и **20*T'**. Показано отнесение сигналов соединения **20*T'** и дополнительные сигналы от минорных (азидной **20*А** и тетразольной **20*T**) форм (DMSO, 43 °C, BRUKER AVANCE 700 МГц)

В спектре 2D ^{15}N - ^1H HMBC для сигналов соединения **20*T'** регистрировались кросс-пики между атомом $^{15}\text{N7}$ и протонами бензольного фрагмента (H10, H11, H12, H13) (Рис 9). Количественное измерение КССВ ^{15}N - ^1H методом спин-эхо удалось у сигналов H10 и H11 (0.11 Гц и 0.19 Гц,

соответственно) (Рис. 10). Эти результаты, также подтверждают способ аннелирования [5,1-с] тетразольного и триазинового циклов в соединении **20*Т'**.

Таким образом, продемонстрировано, что комбинация анализа КССВ ^{13}C - ^{15}N , ^{15}N - ^1H и химических сдвигов в спектре 1D ^{15}N ЯМР может быть использована при установлении особенностей строения полициклических азотсодержащих гетероциклов.

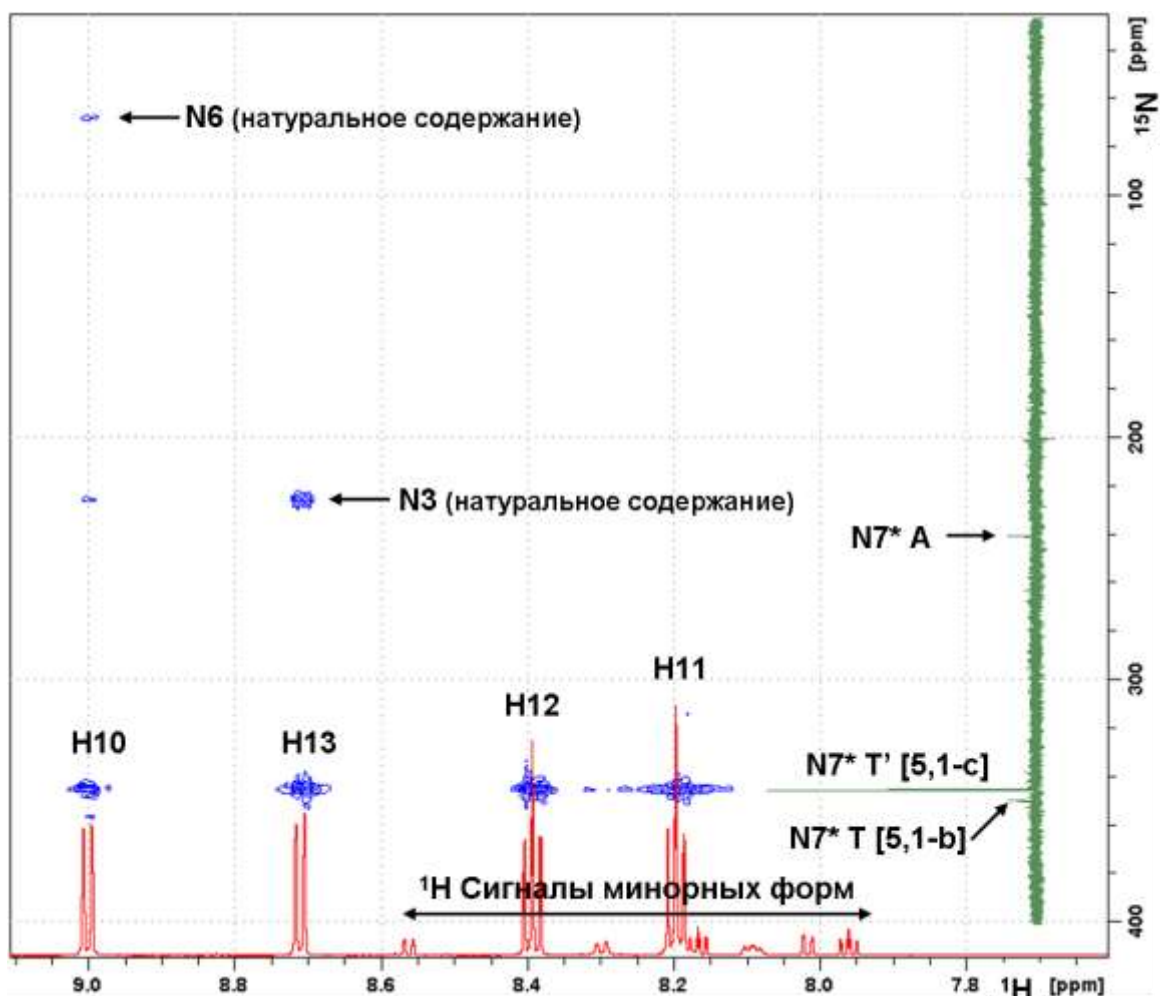


Рис. 9. Фрагмент 2D ^{15}N -HMBC ЯМР спектра соединения **20*Т'**. По вертикальной и горизонтальной оси показано наложение 1D ^1H и ^{15}N ЯМР спектров. Показано отнесение сигналов соединения **20*Т'** и дополнительные сигналы от минорных (азидной **20*А** и тетразольной **20*Т**) форм. Сигналы изотопнообогатленного атома азота N7 отмечены звездочкой. В 2D ^{15}N -HMBC

спектре на натуральном содержании ^{15}N также наблюдаются ядра N3 и N6 (DMSO, 43 °C, BRUKER AVANCE 700 МГц)

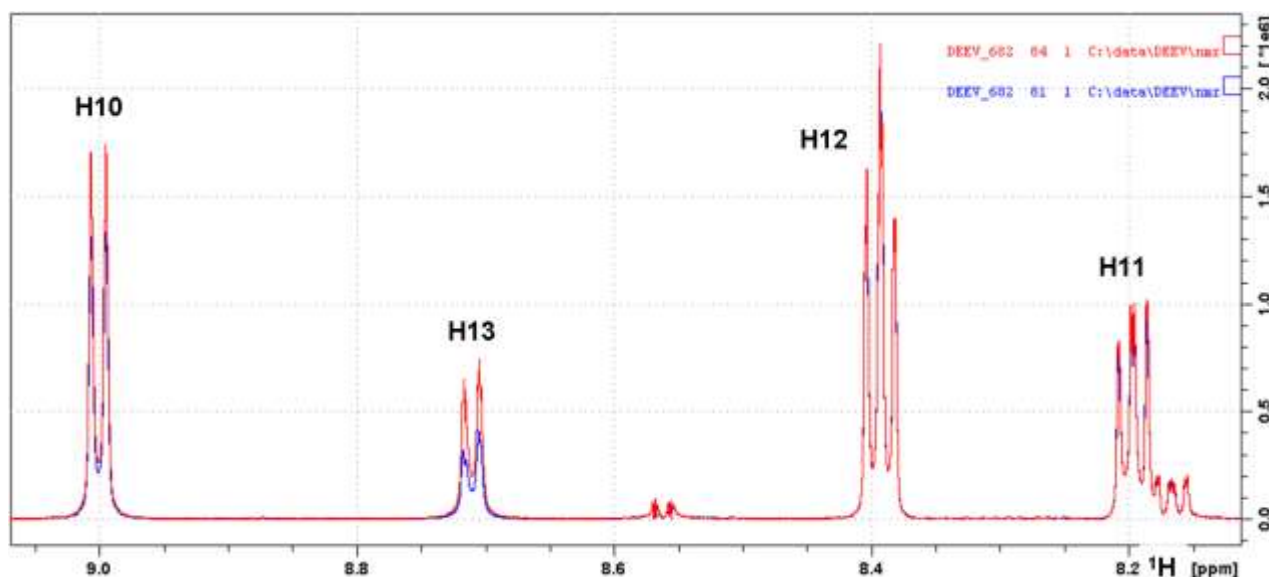


Рис. 10. Фрагменты 1D ^1H спин-эхо спектров ЯМР соединения **20*T'** измеренных с/без селективной инверсии намагниченности ядра $^{15}\text{N7}$. Задержка спин-эхо 2 с. Падение интенсивности сигналов H10 и H13 при селективной инверсии $^{15}\text{N7}$ указывает на наличие КССВ J_{HN} у этих протонов. Спектры показаны в режиме абсолютной интенсивности, чтобы исключить влияние формы линий на измерение J_{HN} (DMSO, 43 °C, BRUKER AVANCE 700 МГц)

Использование $[2-^{15}\text{N}]$ -5-аминотетразола **21*** позволяет ввести изотопную метку в структуру азолазинов. Особенностью в этом случае является образование смеси двух изотопомеров **a** и **b**, различающихся положением атома ^{15}N (Схема 14). Получение двух изотопомерных азолазинов объясняется таутомерными превращениями в соединении **21***.

Для предотвращения образования смеси изомеров в синтезе тетразолоазинов, исходя из 5-аминотетразола, нами разработан метод синтеза $[2,3-^{15}\text{N}]$ -5-аминнотетразола **21**** с использованием ^{15}N -аминогуанидина **22*** (^{15}N , 86%) и ^{15}N меченого нитрита калия (^{15}N , 86%). (Схема 15).

Включение двух изотопных меток подтверждают данные масс-

спектрометрии (M+H 87,21).

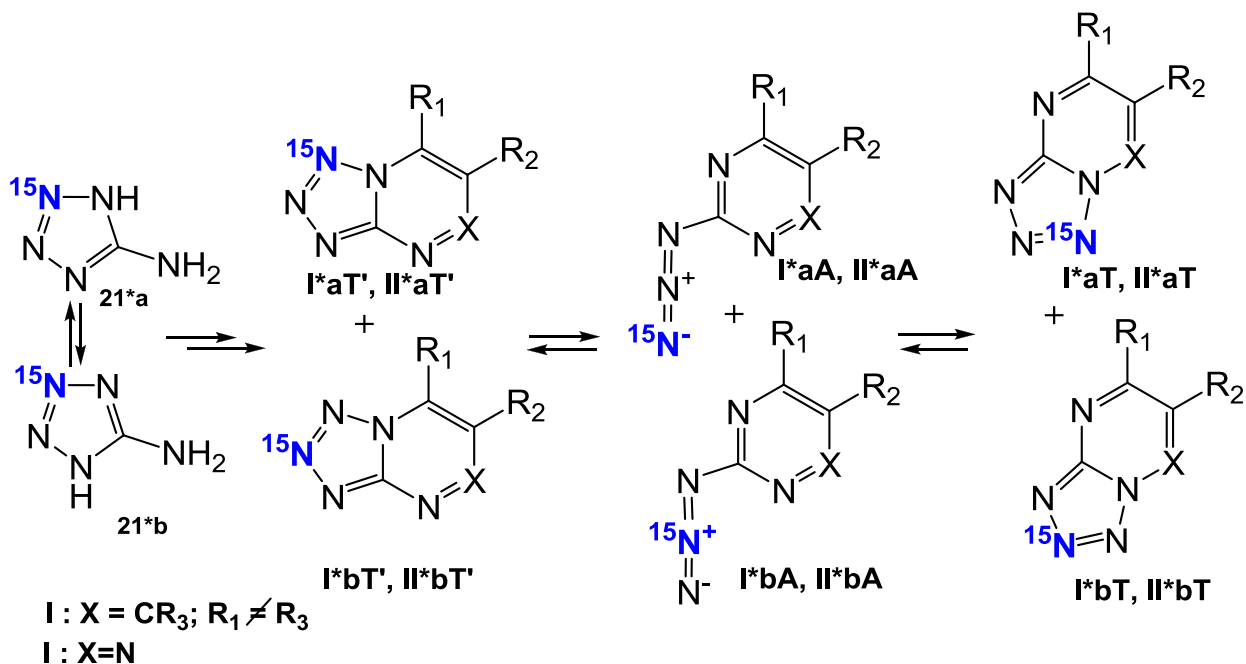


Схема 14

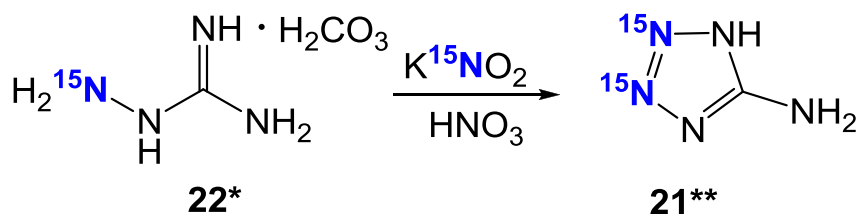


Схема 15

Использование гетариламина **21**** в реакции конденсации с 1-фенил-1,3-бутандионом был получен [1,2-¹⁵N]-тетразоло[1,5-*a*]пиримидин **23**Т**, который регистрировался в растворе DMSO-*d*₆ в виде циклической формы (Схема 16). Так, в спектре 1D ¹H ЯМР фиксировался один набор сигналов. Необходимо отметить, что в 1D ¹⁵N ЯМР спектре соединения **23**Т** регистрировались два дублета (*J*_{NN} = 16.8 Гц), которые соответствовали сигналам ¹⁵N8 и ¹⁷N7, соответственно (Рис 11). Отнесение сигналов меченых атомов азота проведено с учетом химических сдвигов в спектре ¹⁵N, а также на основании анализа КССВ ¹³C-¹⁵N в углеродном спектре, записанном без

развязки от протонов.

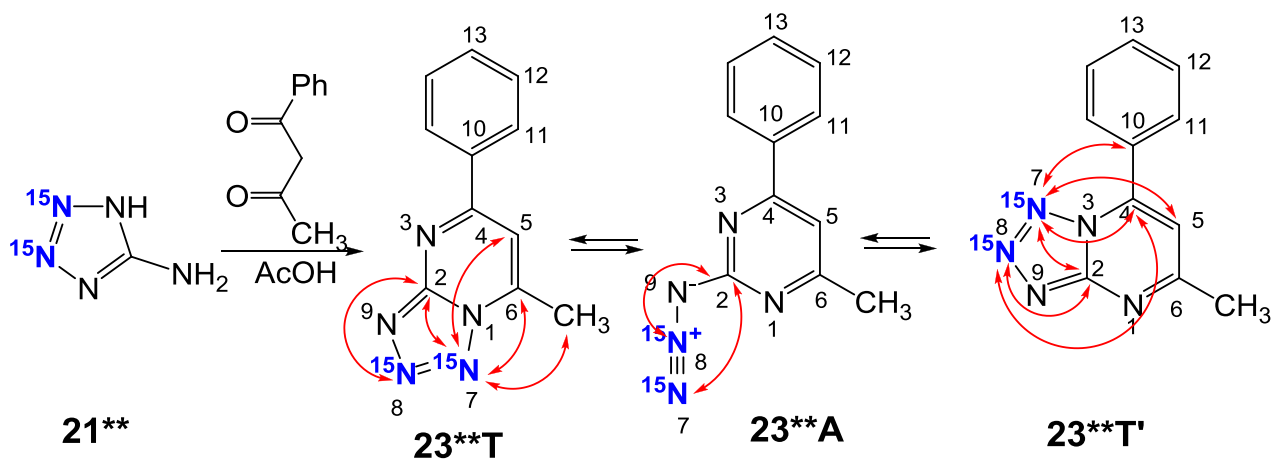


Схема 16

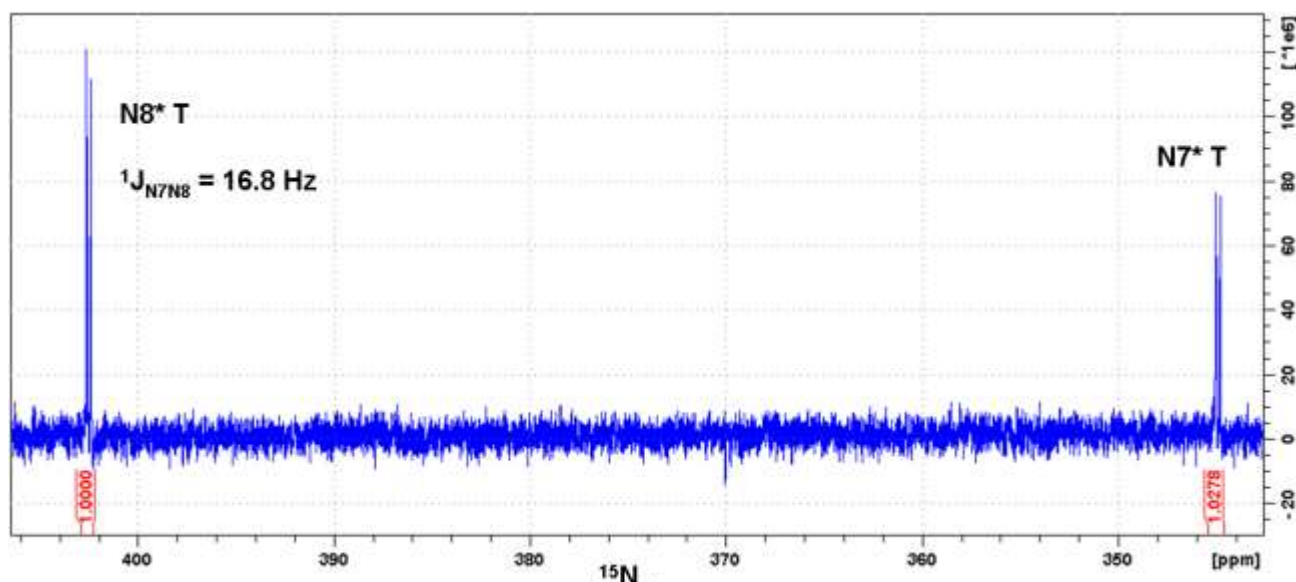


Рис. 11. Фрагмент спектра 1D ^{15}N ЯМР соединения **23**Т**. Показано отнесение сигналов соединения (DMSO, 43 °С, BRUKER AVANCE 700 МГц)

Измерения J_{CN} -констант проведено двумя способами. Первый метод был основан на деконволюции спектральных линий в 1D ^{13}C -ЯМР спектрах, накопленных с селективной развязкой от ядер ^{15}N . Второй подход включал в себя эксперименты «спин-эхо» с селективной инверсией намагниченности ^{15}N ядер. В растворе DMSO- d_6 образца **23**Т'** константы с атомом N7 обнаружены у атомов C4, C5, C6 и углерода метильной группы (Рис 12).

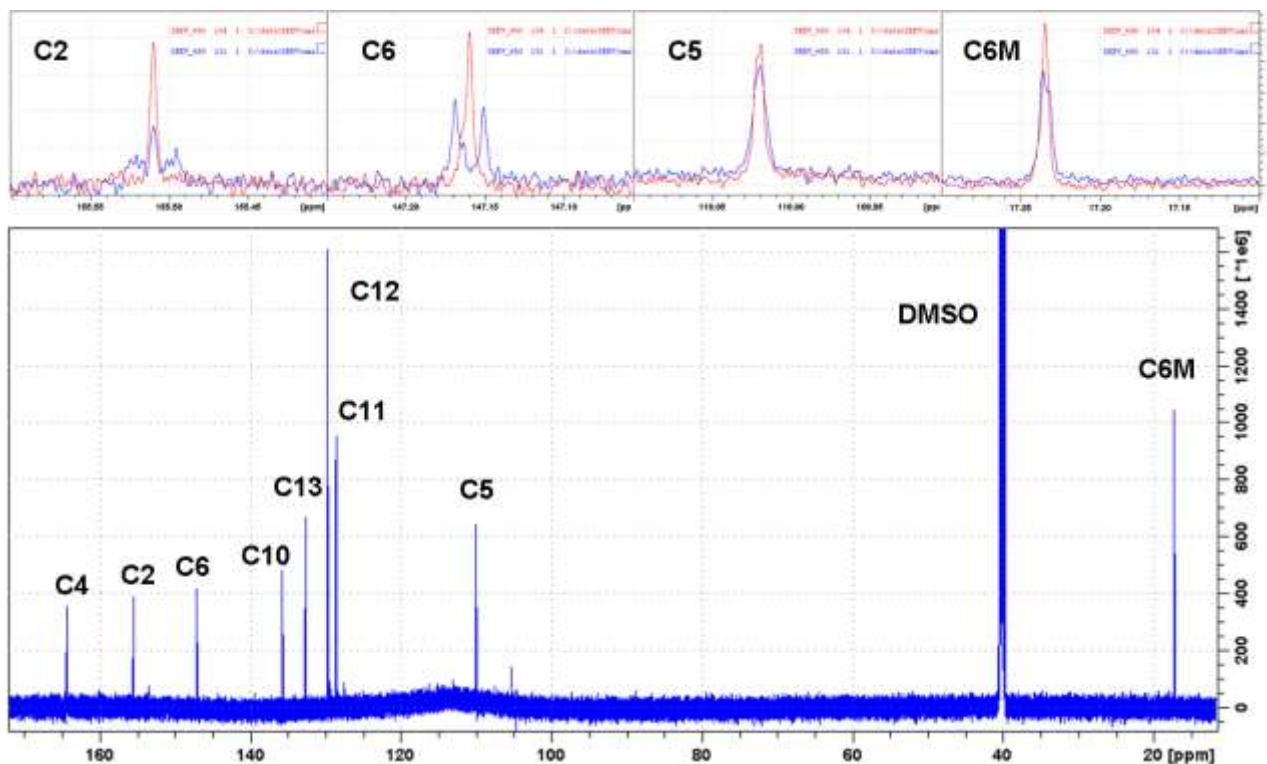


Рис. 12. (внизу) Фрагмент спектра 1D ^{13}C ЯМР соединения **23**Т** с развязкой от ядер ^{15}N . Показано отнесение сигналов соединения. (вверху) Структура и интенсивность сигналов C2, C6, C5, C6M тетразола **23**Т** в 1D ^{13}C спектрах с развязкой/без развязки от ядер ^{15}N (DMSO, 43 °C, BRUKER AVANCE 700 МГц)

Кроме того, для сигналов эти атомы углерода характеризуются гетероспиновым взаимодействием с атомом $^{15}\text{N}8$ и наличием КСВ $^{13}\text{C}-^{15}\text{N}$. В случае образования альтернативной циклической структуры **23**Т** спин-спиновое взаимодействие наблюдалось у сигнала C10. Азидоформа **23**А** форма характеризовалась бы исключительно наличием только двух констант $^{13}\text{C}-^{15}\text{N}$ у сигнала атома C2 (Схема 16).

Вывод о строении соединения **23**Т** подтверждается результатами 2D $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ ЯМР-экспериментов, которые позволили зафиксировать кросс-пик для сигналов атомов H5 и протонов метильной группы с атомом $^{15}\text{N}7$ (Рис 13). Для сигналов протонов метильной группы наблюдалось дополнительное спин-спиновое взаимодействие с атомом $^{15}\text{N}8$.

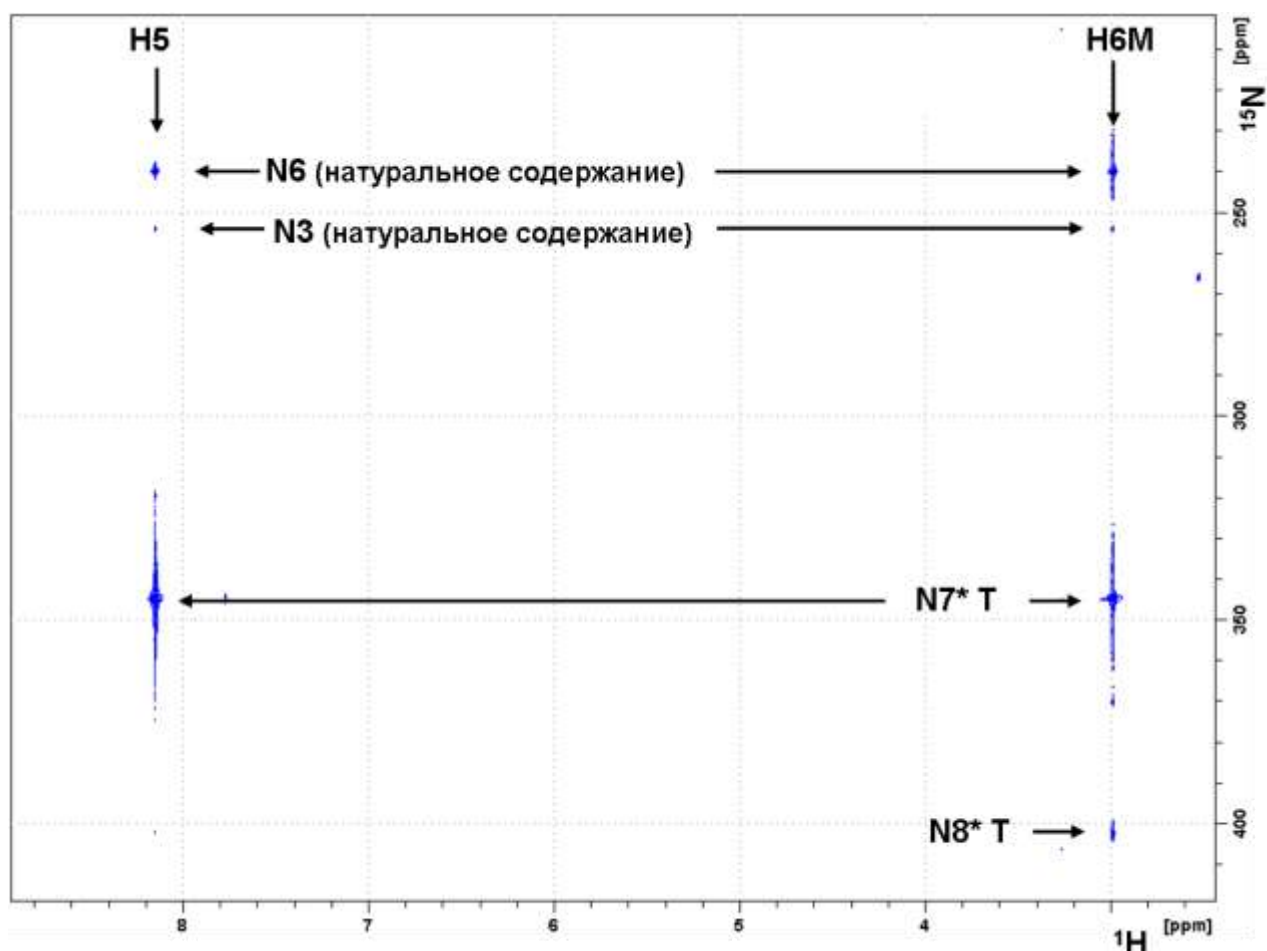


Рис. 13. Фрагмент 2D ^{15}N -HMBC ЯМР спектра соединения **23**Т**. Показано отнесение сигналов соединения. Сигналы изотопнообогащенных атомов азота N7 и N8 отмечены звездочкой. В 2D ^{15}N -HMBC спектре на натуральном содержании ^{15}N также наблюдаются ядра N3 и N6 (DMSO, 43 °C, BRUKER AVANCE 700 МГц)

Измерить константы спин-спинового взаимодействия ^{15}N - ^1H удалось экспериментами спин-эхо с селективной развязкой от атомов N8 и N7 (Рис 14). При этом КССВ ^{15}N - ^1H были измерены для атомов H5 и сигналов метильного заместителя в пиримидиновом цикле.

Таким образом, нами описан еще один пример использования комплексного анализа гетероспиновых взаимодействий ^{13}C - ^{15}N и ^{15}N - ^1H .

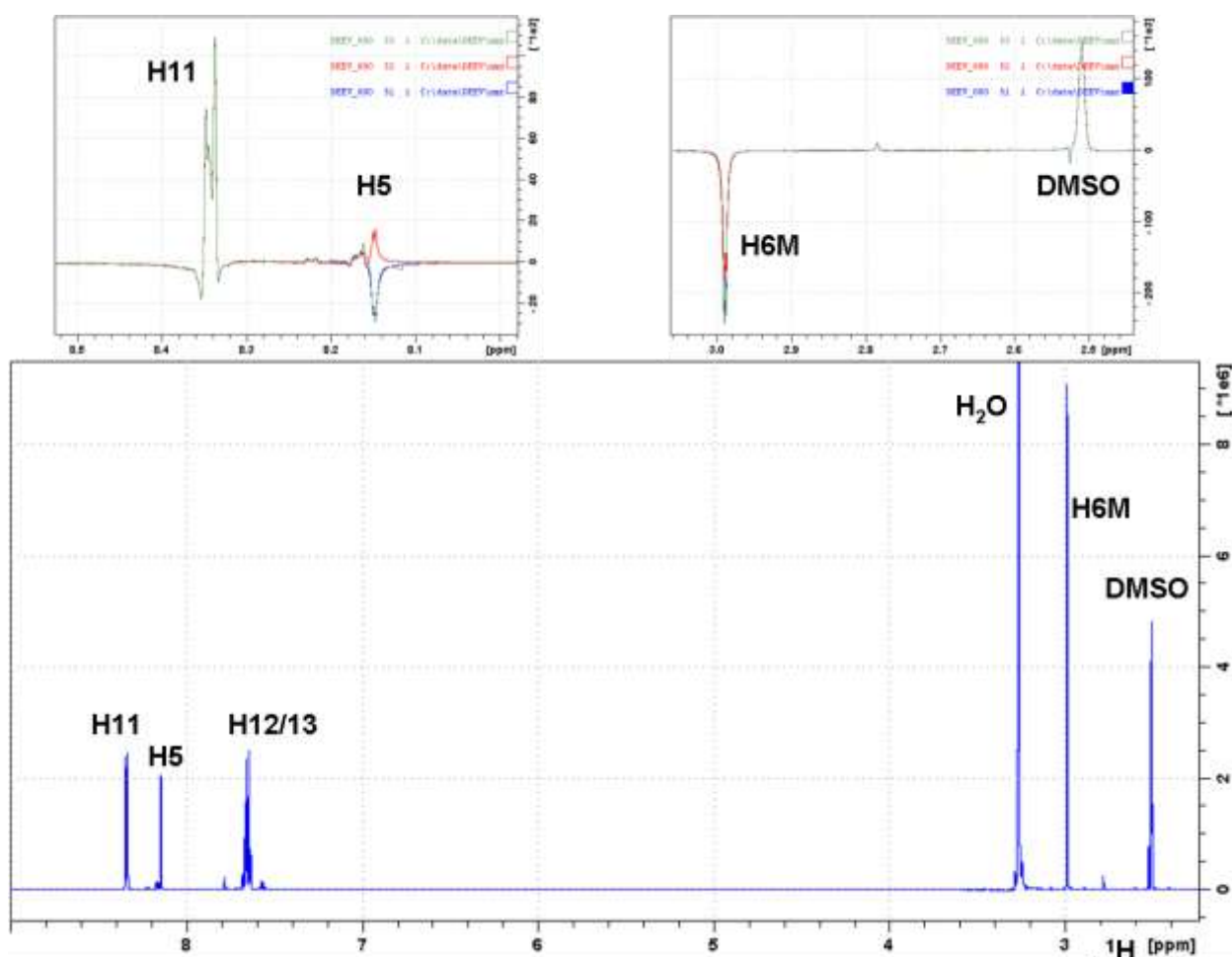


Рис. 14. (внизу) Фрагмент спектра 1D ^1H ЯМР соединения **23**Т**. Показано отнесение сигналов соединения. (вверху) Фрагменты 1D ^1H спин-эхо спектров ЯМР соединения **23**Т** измеренных без (зеленый) и с селективной инверсией намагниченности ядер $^{15}\text{N}7$ (красный) и $^{15}\text{N}8$ (синий). Задержка спин-эхо 1.2 с. Изменение интенсивности сигналов H5 и H6M при селективной инверсии ^{15}N указывает на наличие КССВ J_{HN} у этих протонов (DMSO, 43 °C, BRUKER AVANCE 700 МГц)

Данные 1D ^1H и ^{15}N ЯМР спектров

Соединение	Растворитель	^1H ЯМР,	^{15}N ЯМР
		δ , м.д.	δ , м.д.
19*Т	DMSO- d_6	2.60 (с, 3H, Me), 6.30 (уш, с, 1H, H5)	345.75 N7, 225.0 N3
19*Т'	DMSO- d_6	2.38 (с, 3H, Me), 5.93 (уш, с, 1H, H5)	346.74 N7 243.6 N3 121.5 N1
20*Т'	DMSO- d_6	8.20 (м, 1H, H11), 8.39 (м, 1H, H12), 8.71 (м, 1H, H13, J_{NH} 0.15 Гц), 9.00 (м, 1H, H10, J_{NH} 0.11 Гц)	224.8 N3 67.6 N6 345.03 N7
20*Т	DMSO- d_6	7.96 (м, 1H, H11), 8.01 (м, 1H, H13), 8.16 (м, 1H, H12), 8.56 (м, 1H, H10)	345.04
20*А	DMSO- d_6	8.29 (м, 1H, H10), 8.09-8.20 (м, 2H, H12+H13) [#] , 8.09 (м, 1H, H11)	240.20
23**Т	DMSO- d_6	2.99 (д, 3H, Me, $J_{\text{CN}7}$ 0.22 Гц, $J_{\text{CN}8}$ 0.1 Гц), 8.15 (д, 1H, H5, $J_{\text{CN}7}$ 0.64 Гц, $J_{\text{CN}8}$ 0.1 Гц),	239.67 N1 253.81 N3 344.86 N7 J_{NN} 16.8 Гц 402.46 N8 J_{NN} 16.8 Гц ND N9

[#] - происходит перекрытие с сигналом H11 соединения **20*Т'**.

Данные ^{13}C ЯМР соединений **19*Т**, **19*Т'**, **20*Т'** и **23*Т** (DMSO)

Соединения	δ , м.д, J/Гц				
	C2	C4	C5	C6	Другие Сигналы
19*Т^a	150.98	161.20	109.15	145.28	16.33 (Me)
19*Т'^b	151.53 $J_{\text{CN}} 2.26$	154.36 $J_{\text{CN}} 2.05$	98.666 $J_{\text{CN}} 0.7$	154.91 $J_{\text{CN}} 0.2$	19.263 (Me) $J_{\text{CN}} 0.6$
20*Т'^c	153.23 $J_{\text{CN}} 2.21$	122.82 $J_{\text{CN}} 2.59$	140.15 $J_{\text{CN}} 0.61$		131.72 130.99 138.32 116.07 $J_{\text{CN}} 0.62$
23**Т^b	155.505 $J_{\text{CN}7} 2.57$ $J_{\text{CN}8} 2.48$	164.378 $J_{\text{CN}7} 0.29$ $J_{\text{CN}8} 0.18$	110.018 $J_{\text{CN}7} 0.60$ $J_{\text{CN}8} 0.49$	147.158 $J_{\text{CN}7} 3.14$ $J_{\text{CN}8} 0.73$	17.236 $J_{\text{CN}7} 0.1$ $J_{\text{CN}8} 0.2$ 135.804 (C10) 128.591 (C11) 129.736 (12) 132.681(C13)

а- КССВ ^{13}C - ^{15}N не определялись из-за уширения сигналов

б- КССВ ^{13}C - ^{15}N измерены методом вписывания и экспериментами «спин-эхо».

с- КССВ ^{13}C - ^{15}N измерены методом вписывания

3.2. КОНСТАНТЫ ССВ ^{13}C - ^{15}N В ИССЛЕДОВАНИИ СТРОЕНИЯ ТЕТРАЗОЛО[1,5-*a*]ПИРИМИДИНОВ

Константы спин-спинового взаимодействия могут быть использованы для доказательства способа аннелирования азольного и азиновых циклов в ряду 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинов. Проблема установления строения данного класса соединения является актуальной, поскольку она затрагивает как свойства данных гетероциклических систем, так и их химические превращения.

Известно, что взаимодействие амино-1,2,4-триазолов **24** с

несимметричными β -дикарбонильными соединениями **25** ($R_2 \neq R_3$) может приводить к образованию двух бициклических продуктов **26** и **27**. Необходимо отметить, что пиримидины **26** и **27** способны обратимо изомеризоваться друг в друга по механизму перегруппировки Димрота. В этом случае единственным надежным методом, для определения структуры продуктов взаимодействия является рентгеноструктурный анализ.

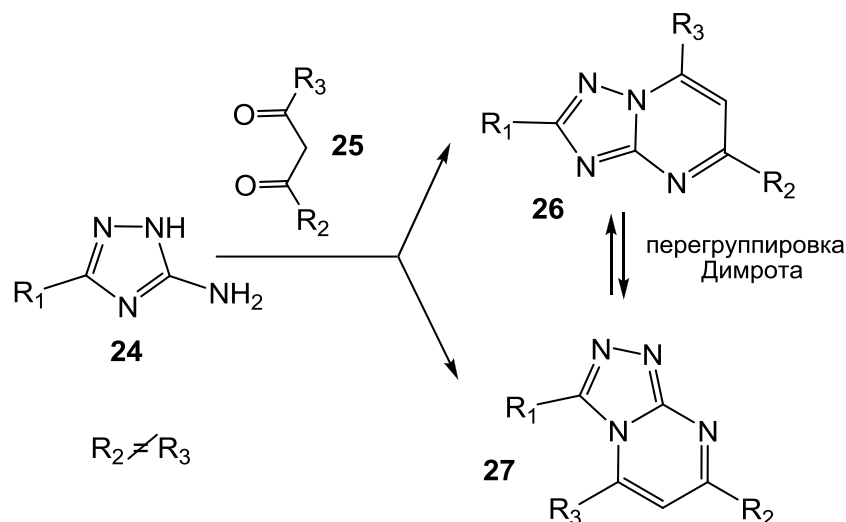


Схема 17

С использованием изотопномеченных производных, предложен новый метод доказательства строения 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинов с использованием КССВ ^{13}C - ^{15}N .

Реакцией конденсации $[2-^{15}N]$ -5-амино-1,2,4-триазола **28*** (степень обогащения по ^{15}N 86 %) с формилпроизводным **29** был получен гетероцикл **30*** (Схема 18). Последующий кислотный гидролиз соединения **30*** привел к образованию пиримидона **31***.

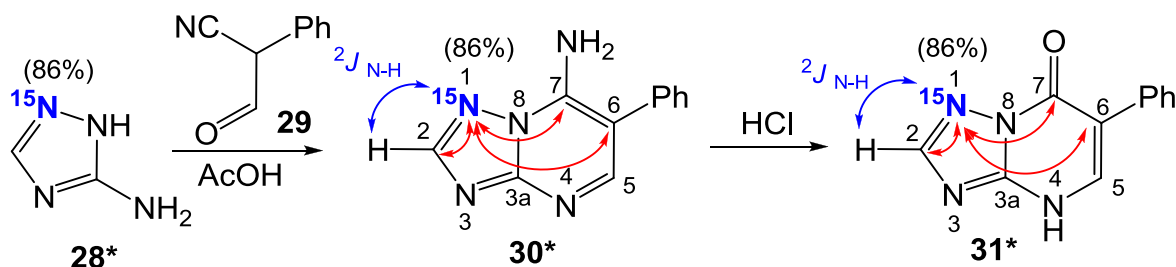


Схема 18

Присутствие атома ^{15}N в соединениях **30*** и **31** подтверждают данные

масс спектрометрии ($M+H$), а также присутствие дублетов в спектрах 1D 1H ЯМР у сигналов атомов H2 с константой $J_{NH} = 16$ Гц (Рис. 6). Соотношение интегральной интенсивности меченой и немеченой компоненты в протонных спектрах соединений **30*** и **31*** подтверждает изотопное обогащение 86%.

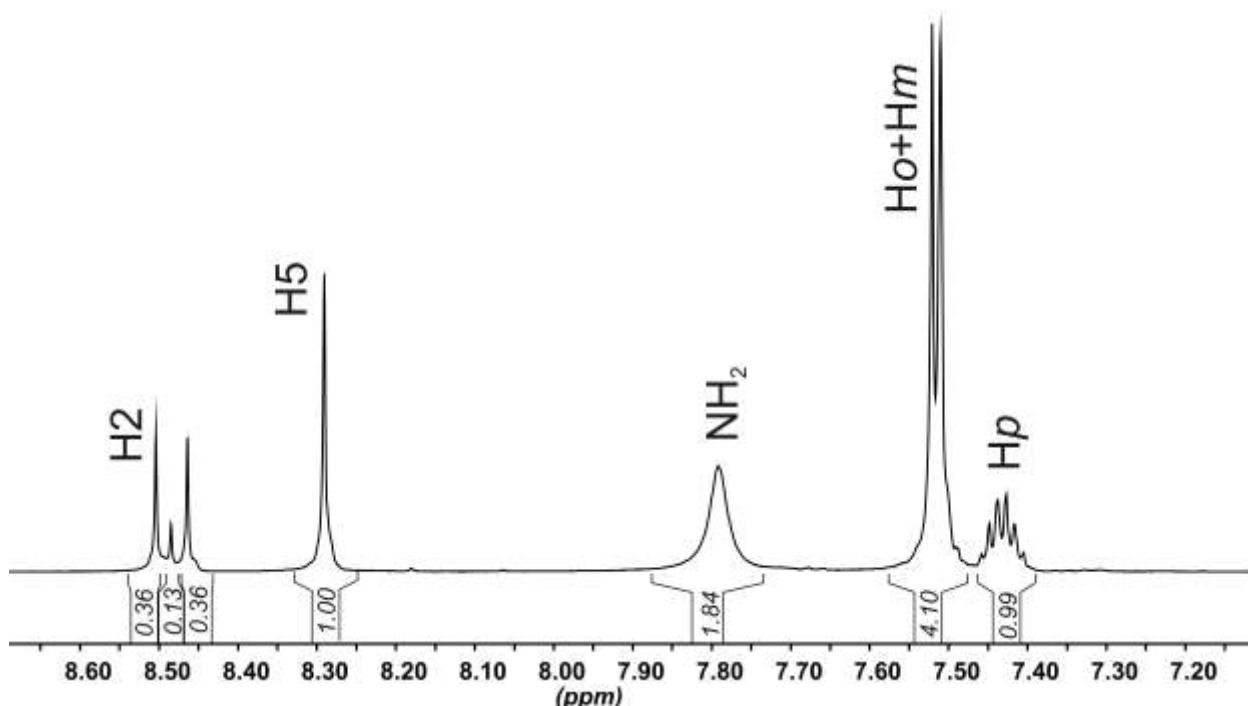


Рис. 15. Спектр 1D 1H ЯМР гетариламина **30*** (DMSO, Bruker AVANCE II 400 МГц)

В углеродных спектрах соединений **30*** и **31*** наблюдались КССВ ^{13}C - ^{15}N у сигналов атомов C2, C7 и C6. Для сигналов атомов углеродов C2 и C7 J_{CN} -константы были измерены прямым методом (Рис. 7, Экспериментальная часть). Из-за уширения сигнала атома C6 спин-спиновое взаимодействие фиксировалось только визуально. Константы измерены прямым методом при анализе мультиплетов в спектре 1D ^{13}C ЯМР, записанном без развязки от протонов. Несмотря на то, что в спектрах триазолопиримидинов **30*** и **31*** регистрировались константы только у двух атомов, наличие константы у атомов углерода C2 и C7 полностью подтверждает строение полученных соединений.

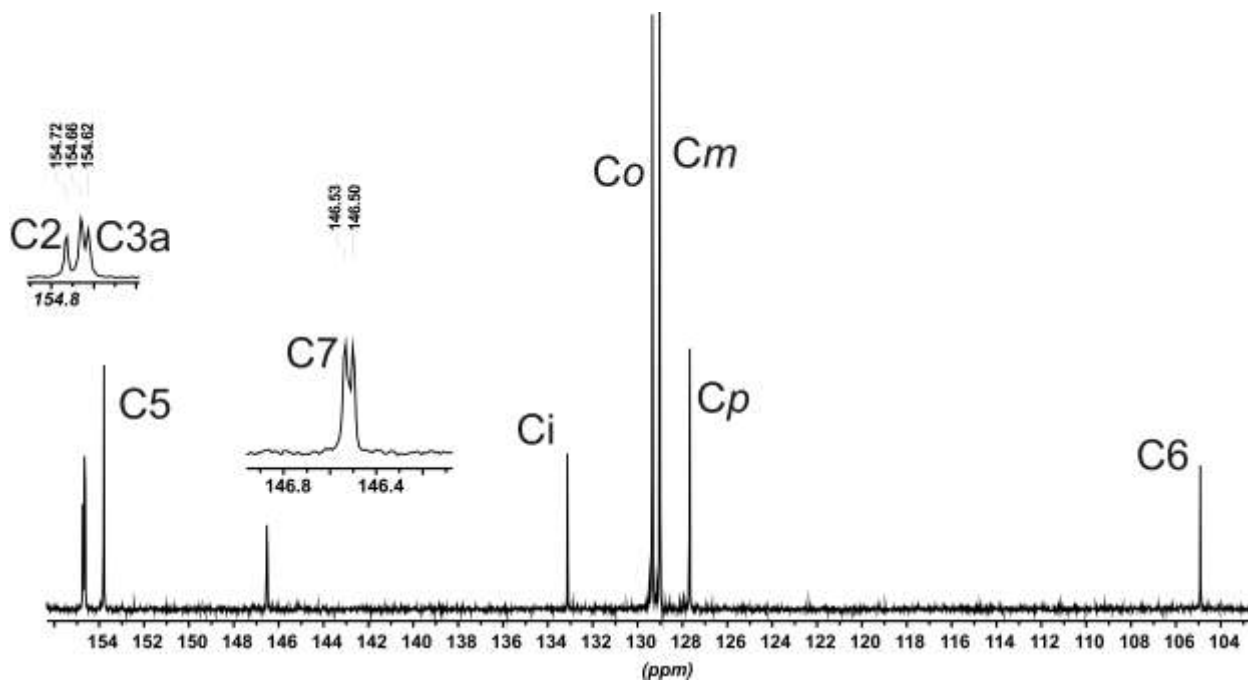


Рис. 16. Спектр 1D ^{13}C ЯМР спектр соединения **30***

3.3. СИНТЕЗ ИЗОТОПНОМЕЧЕНОГО ПРОТИВОВИРУСНОГО ПРЕПАРАТА [$^2\text{H}_3$, $^{15}\text{N}_3$]-ТРИАЗАВИРИН

Включение стабильных изотопов (^2H , ^{13}C , ^{15}N) в структуру биологически активных соединений используется в качестве эффективного подхода для создания способов их детектирования методами масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии. Применение этого метода позволяет изучать фармакокинетику и пути метаболизма лекарственных препаратов [11-15].

Производные 6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов относятся к новому классу соединений, обладающих противовирусной активностью [16,17]. Особое место в этом ряду занимает препарат «триазавирин» **32** (TZV), проходящий вторую фазу клинических испытаний, и эффективный в отношении различных штаммов вируса гриппа, включая штаммы H5N1 (вирус гриппа птиц) [18-20].

Нами при выполнении данного проекта предложены метод синтеза соединения **32**, содержащего стабильные изотопы ^{15}N и ^2H в азольном, и в азиновом циклах.

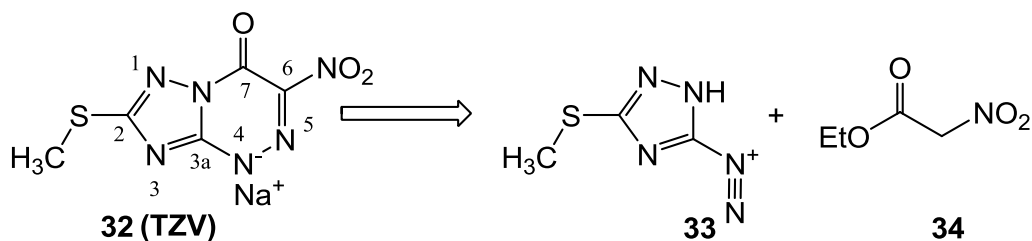


Схема 19

Схема синтеза натриевой соли **32** основана на реакции азосочетания соли диазония **33** с нитроуксусным эфиром **34** (Схема 19) [18]. Соединение **33** получают из соответствующего 3-метилтио-5-амино-1,2,4-триазола и азотистой кислоты. При этом соль диазония не выделяют в чистом виде, а используют в виде полученного раствора. Таким образом, включение атомов ^{15}N и ^2H в структуру соединений **33** и **34** позволит получить изотопномеченое производное **TZV**.

На втором этапе проекта был разработан метод синтеза соединения **32***- $^2\text{H}_3$, содержащего два изотопа ^{15}N и атомы дейтерия. (Схема 20).

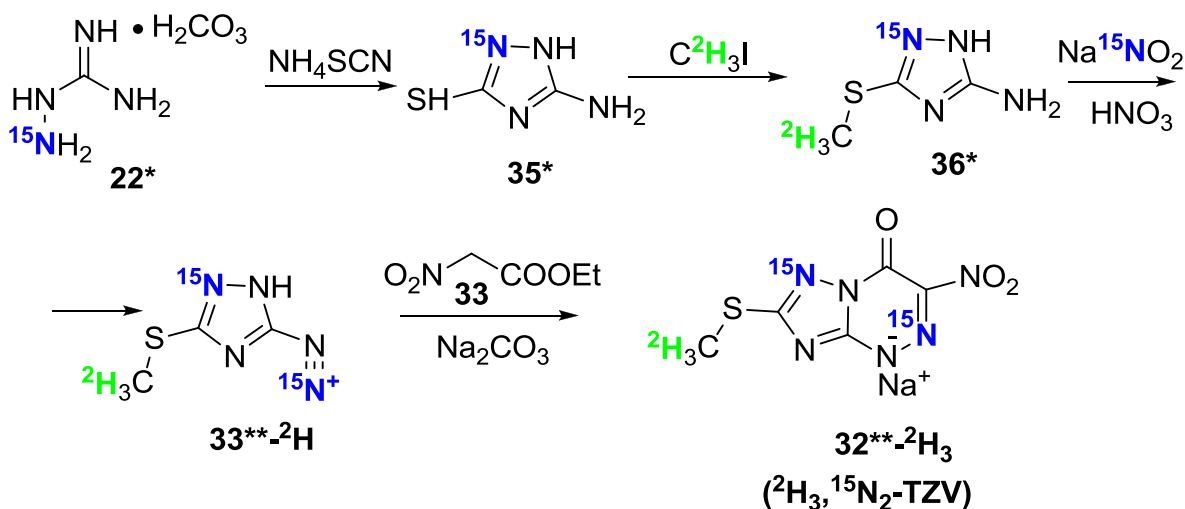


Схема 20

В продолжение этого направления был предложен метод введения изотопа ^{15}N с использованием меченого нитроуксусного эфира **34***, который был получен в соответствии со схемой 21.

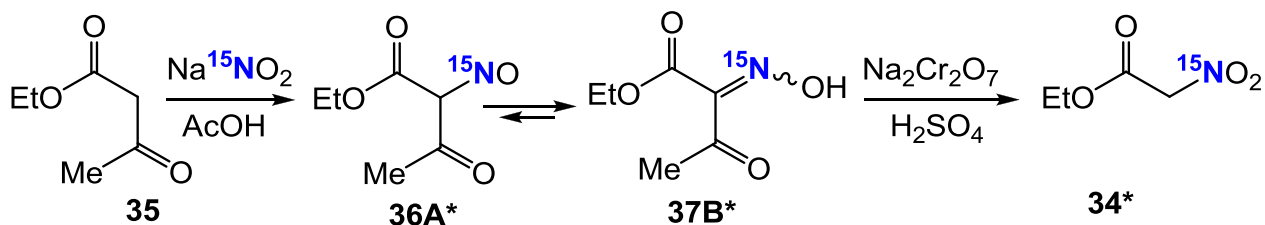


Схема 21

В качестве донора изотопа ^{15}N для синтеза меченого производного этилнитроацетата **35** был выбран обогащенный нитрит натрия (^{15}N , 98%), который при взаимодействии с ацетоуксусным эфиром в среде уксусной кислоты образовывал нитрозопроизводное **36A***, существующее в растворе ДМСО- d_6 преимущественно в виде оксима **37B*** (Схема 21). Необходимо отметить, что соединение **37B*** регистрируется в виде смеси *E* и *Z* изомеров в соотношении 10:1. Вывод о строении оксима **37B*** сделан на основании данных ^1H и ^{15}N ЯМР спектроскопии. В ^{15}N ЯМР спектре соединения **37B*** наблюдалось два сигнала ядер ^{15}N δ 401,31 м.д. и δ 396.86 м.д., а в ^1H ЯМР спектре присутствовало два синглета в области δ 13,25 м.д. и δ 12.99 м.д., соответствующие ОН-группам. В тоже время, точное отнесение сигналов в ^{15}N и ^1H ЯМР спектрах соединения **37B*** к изомерным формам *E* и *Z* не проводилось. Последующая обработка соединения **37B*** бихроматом натрия позволила синтезировать меченый нитроуксусный эфир **34***. При этом анализ методом ^1H ЯМР показал, что в результате реакции окисления нами было получена смесь соединений **34*** и **37B*** в соотношении 3:1, соответственно. В последующем эта смесь была использована в реакции азосочетания без дополнительной очистки. Образование соединения **34*** подтверждалось наличием в ^1H ЯМР спектре дополнительного расщепления у сигнала метиленовой группы (CH_2), возникающего вследствие спин-спинового взаимодействия с ядром ^{15}N ($^2J_{\text{HN}}$ 2.0 Гц).

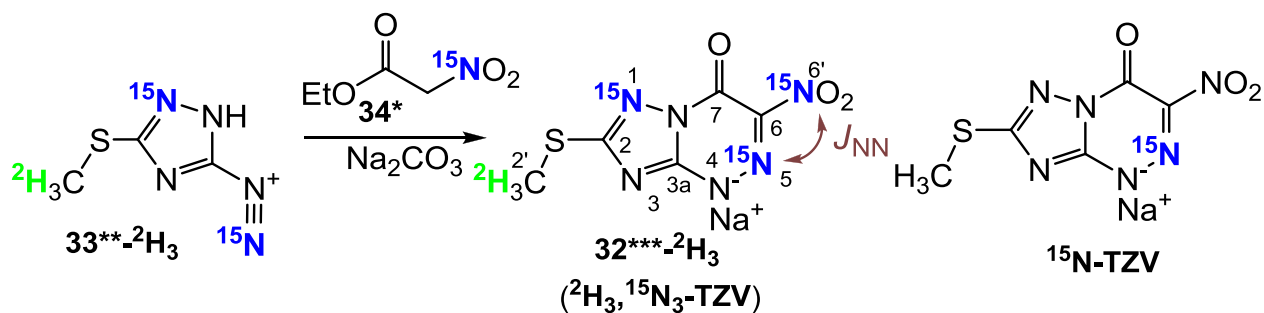


Схема 22

Последующее взаимодействие изотопномеченных соединений $33^{**}\text{-}^2\text{H}_3$ и 34^* привело к образованию триазавирина $^2\text{H}_3, ^{15}\text{N}_3\text{-TZV}$, содержащего в своей структуре три атома ^{15}N и три дейтериевых метки (Схема 22).

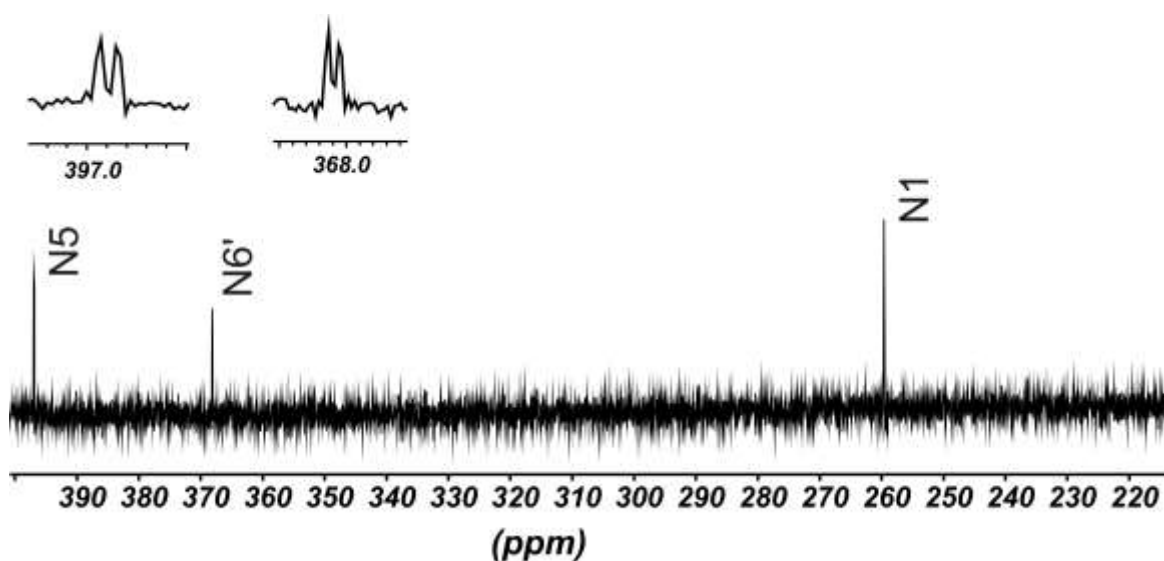


Рис. 17. Спектр 1D ^{15}N ЯМР соединения $33^{**}\text{-}^2\text{H}_3$ (BRUKER AVANCE 700 МГц)

В ^{15}N ЯМР спектре соединения $32^{***}\text{-}^2\text{H}_3$ сигналы атомов N(5) и N(6') регистрируются в виде дублетов с КССВ $^2J_{\text{NN}}$, 6.3 Гц, а сигнал атома N(1) имеет вид синглета (Рис. 17). Такая спектральная картина подтверждает присутствие трех изотопных меток ^{15}N в соединении $32^{***}\text{-}^2\text{H}_3$. Отнесение сигналов атомов азота изотопномеченого «триазавирина» ($^2\text{H}_3, ^{15}\text{N}_3\text{-TZV}$) было проведено с учетом мультиплетности сигналов, а также на основании сравнения химических сдвигов $^{15}\text{N}(5)$ (δ 397.20 м.д.) меченого аналога $^{15}\text{N-TZV}$ [21]. Присутствие атомов ^{15}N в структуре соединения $32^{***}\text{-}^2\text{H}_3$ приводит к появлению гетероядерных констант ССВ $^{13}\text{C}\text{-}^{15}\text{N}$ у сигналов атомов углерода C(2), C(3a), C(6) и C(7) (таблица 1). Кроме того, в

углеродном спектре для сигналов атомов C(2') и C(2) наблюдается регистрация дополнительной мультиплетной составляющей, связанной с наличием спин-спинового взаимодействия ^2H - ^{13}C . Измерение КССВ ^{13}C - ^{15}N проведено на основании 1D ^{13}C ЯМР-экспериментов, записанных с селективной развязкой от ядер ^{15}N . Полученные результаты доказывают селективное включение в структуру **TZV** трех изотопных меток ^{15}N . Кроме того, наличие констант спин-спинового взаимодействия у сигналов C(6) и C(7) с атомом N(1) подтверждает способ аннелирования [5,1-с] между азольным и азиновым циклами в гетероцикле **32***- $^2\text{H}_3$** .

Таким образом, нами разработаны методы селективного включения изотопов ^{15}N и ^2H в различные положения натриевой соли **32**. Получен изотопномеченный противовирусный препарат «триазавирин» **32***- $^2\text{H}_3$** с высоким содержанием атомов ^{15}N и ^2H , который может быть использован, как внутренний стандарт при исследовании фармакокинетики препарата «триазавирин». Исследованы характеристики ^{13}C и ^{15}N ЯМР спектров соединения **32***- $^2\text{H}_3$** .

Таблица 3

Данные ^{13}C и ^{15}N ЯМР спектров соединения **32***- $^2\text{H}_3$**

^{13}C , δ м.д./ nJ Гц					^{15}N , δ м.д./ nJ Гц		
C(2')	C(2)	C(3a)	C(6)	C(7)	N(1)	N(5)	N(6')
13.40*	166.33*	160.70	145.15	143.43	259.91	397.18	368.42
$^1J_{\text{CD}}$	$^2J_{\text{CN}(1)}$	$^2J_{\text{CN}(5)}$	$^1J_{\text{CN}(5)}$ 1.8	$^2J_{\text{CN}(5)}$ 1.3		$^2J_{\text{NN}}$	$^2J_{\text{NN}}$
21	5.1	2.1	$^1J_{\text{CN}(6)}$	$^2J_{\text{CN}(6)}$ 5.3		6.3	6.3
	$^3J_{\text{CD}}$ 0.7	$^2J_{\text{CN}(1)}$	23.4	$^2J_{\text{CN}(1)}$ 3.3			
		0.4	$^3J_{\text{CN}(1)}$ 1.4				

* сигналы содержат дополнительную мультиплетную составляющую вследствие спин-спинового взаимодействия ^2H - ^{13}C

3.4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ^{15}N МЕЧЕНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ИЗУЧЕНИИ ОСОБЕННОСТЕЙ ХИМИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ ПОЛИАЗОТИСТЫХ КОНДЕНСИРОВАННЫХ ГЕТЕРОЦИКЛОВ

Одной из значимых функционализаций NH-азолоазинов является реакция алкилирования. Большое число алкильных фрагментов от адамантилкатиона до соединений, содержащих сахарные фрагменты, используется для создания биологически активных соединений. Одно из направлений поиска соединений с выраженной противовирусной активностью считается разработка методов синтеза аналогов ациклических аналогов, в том числе и на основе 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинов. Выбор в качестве оснований 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинов целесообразен тем, что в ряду данного класса соединений уже обнаружены соединения с выраженными противовирусными свойствами. В связи с этим введение остатков рибозы или заместителей, моделирующих сахарный фрагмент, позволит усилить или модифицировать биологические свойства 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинов. Эффективность данного подхода продемонстрирована на примере производных 6-фенил-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он [22]. Так, введение гидроксibuтильного и гидроксibuтенильного заместителей позволило обнаружить новый класс ингибиторов вируса простого герпеса первого типа.

Нами разработан синтез аналогов противовирусного аналога ацикловира на основе 6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидина **31** (Схема 23). В основе предложенного подхода лежит реакция гликозилирования по Форбрюггену. Использование этого приема предполагает использование триметилсилилтрифторметисульфоната (TMSOTf) и ацилированных производных сахаров или остатков, моделирующих гликозидный фрагмент.

Так, обработка NH-гетероцикла **31** (2-ацетоксиэтокси)метилацетатом **38** при комнатной температуре в течение 15 минут привела к образованию смеси соединений **39** и **40** в соотношении 5:1, соответственно. Последующее дезацилирование в метанольном растворе аммиака позволяет получить аналоги ацикловира **41** и **42** (Схема 23).

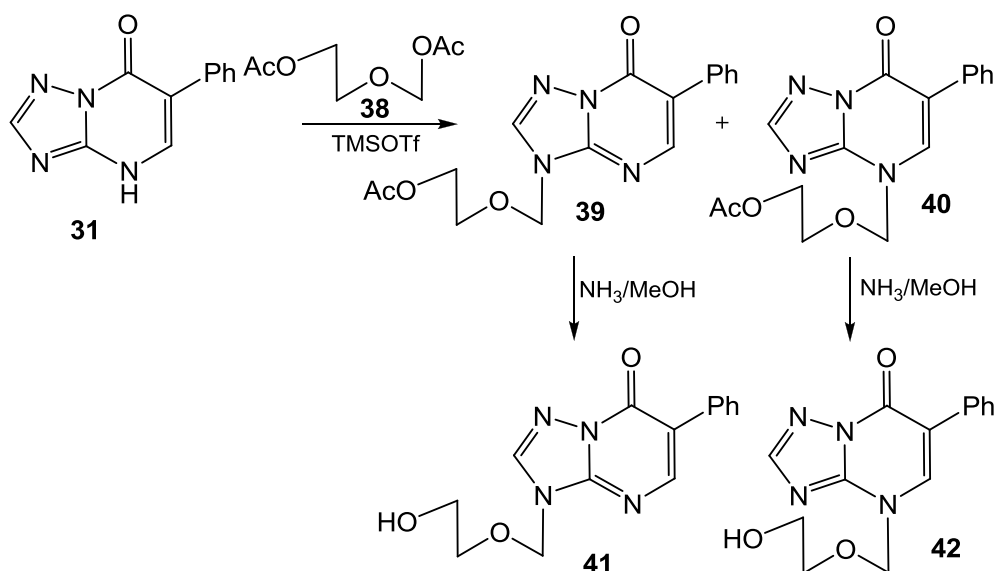


Схема 23

Очевидно, что в данном случае ключевым этапом синтеза аналогов ацикловира является реакция между гетерциклом **31** и диацетатом **38**. Поэтому изучение особенностей данного процесса позволит влиять на соотношение продуктов алкилирования пиридинового производного **31**. Установлено, что увеличение времени реакции до 24 часов приводит к изменению состава продуктов реакции. В результате было зафиксировано, что соотношение между ацетатными производными **39** и **40** составляет 5:6. Таким образом, продукт алкилирования по пиридиновому циклу **40** начинает преобладать. Далее было зафиксировано, что соединения **39** и **40** в условиях алкилирования способны обратимо изомеризоваться друг в друга (Схема 24).

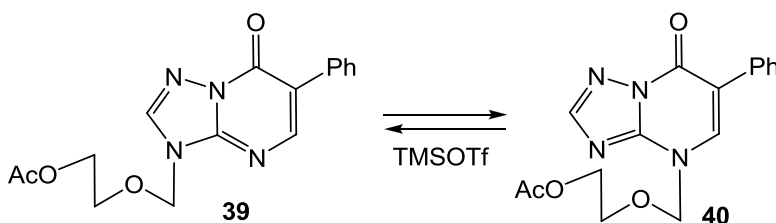


Схема 24

Для изучения механизма изомеризации соединения **39/40** в ацилированное производное **40/39** был проведен эксперимент с использованием изотопномеченого гетероцикла **31*** (изотопное обогащение по

атому ^{15}N 86 %, Рис. 18а). При проведении процесса взаимопревращения соединений **39** и **40** друг в друга был добавлен гетероцикл **31***. В обоих случаях при изомеризации была получена смесь изотопномеченых соединений **31[#]**, **39[#]** и **40[#]**, которая была успешно разделена методом колоночной хроматографии. При этом степень обогащения по атому ^{15}N каждого компонента этой смеси составляла приблизительно 45% (Схема 25).

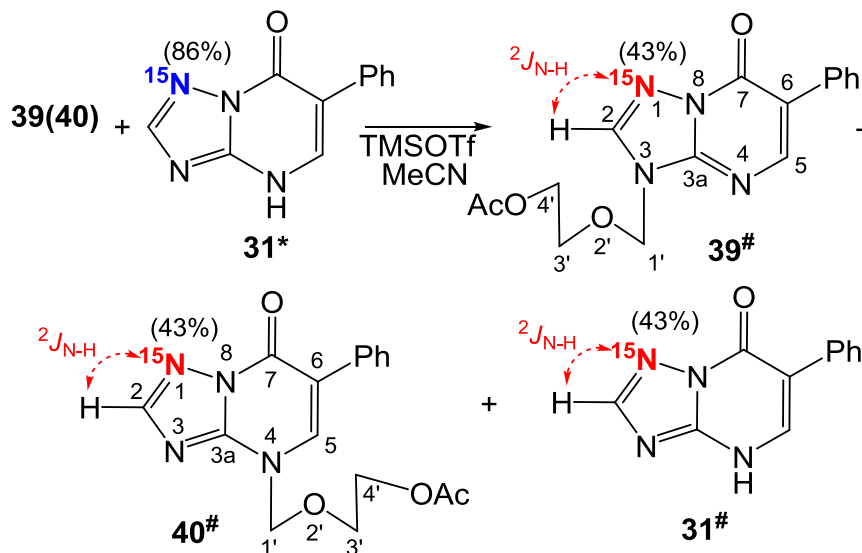


Схема 25

Присутствие атомов ^{15}N в соединениях **31[#]**, **39[#]** и **40[#]** однозначно подтверждают данные 1D ^1H ЯМР спектров, в которых регистрируются константы ССВ $^{15}\text{N}-^1\text{H}$, в виде дублетов ($^2J_{\text{NH}} = 16.0$ Гц). Кроме того, интегральная интенсивность сигналов H2 меченой и немеченой составляющей подтверждает изотопное обогащение $\approx 45\%$ в образующейся смеси соединений (Рис. 18).

Полученные результаты показывают, что производное **31*** включилось в процесс изомеризации соединения **39(40)** в гетероцикл **40(39)**. Это однозначно доказывает, что данная трансформация протекает по межмолекулярному механизму и первой стадией этого процесса является образование катиона **43** (Схема 26).

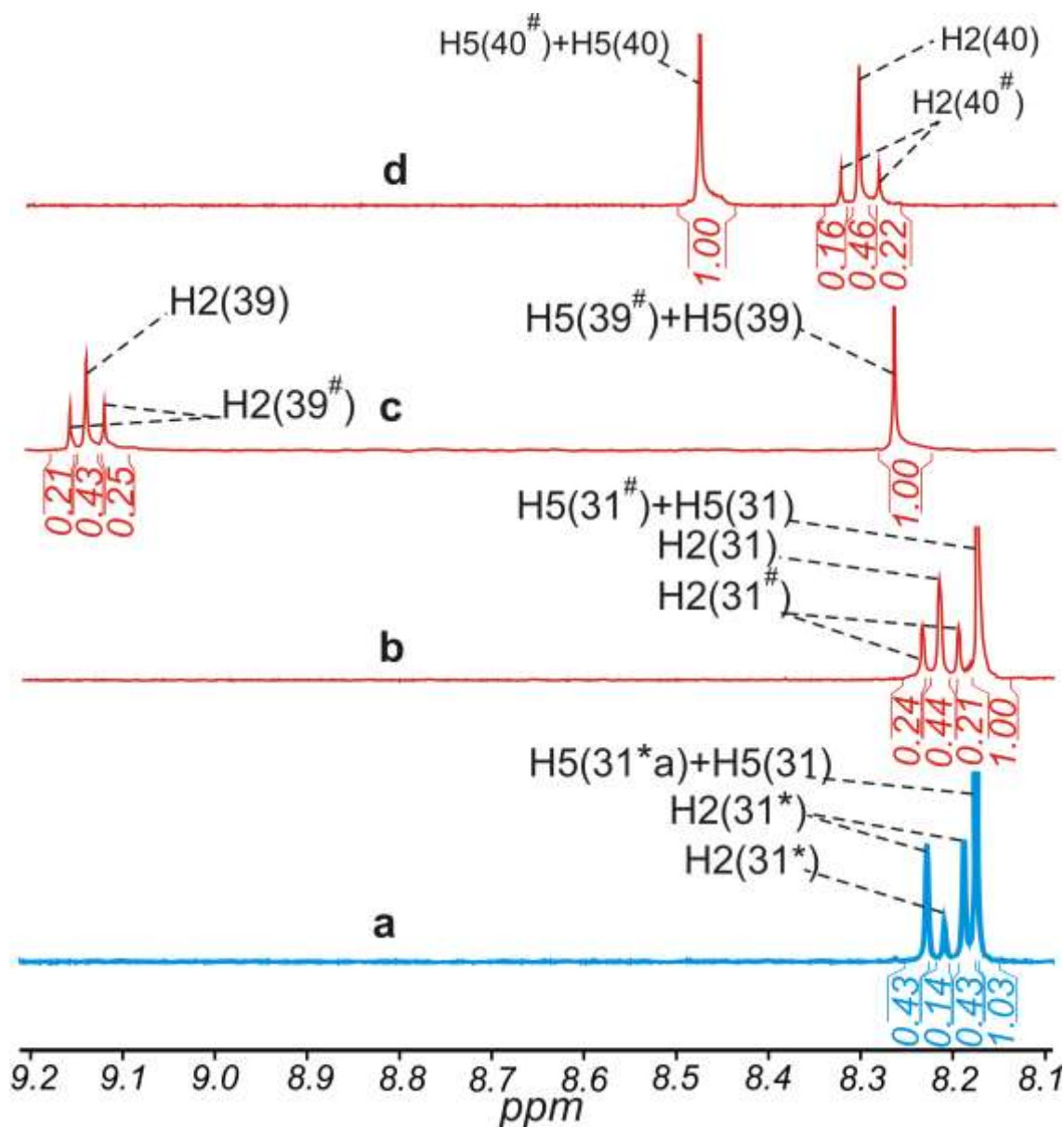


Рис. 18. Сигналы 2H и H5 соединений $31^*(a)$, $31^\#(b)$, $39^\#(c)$ и $40^\#(d)$ в спектрах 1D ^1H ЯМР (DMSO-d_6) (Bruker AVANCE II 400)

Вторым основным интермедиатом, который образуется в процессе взаимного превращения соединений **39** и **40**, является сильильное производное **44**. Несмотря на то, что ацильные производные **39** и **40** в присутствии TMSOTf превращаются в промежуточные структуры **43** и **44**, нельзя полностью исключить образование других интермедиатов, участвующих в данном процессе.

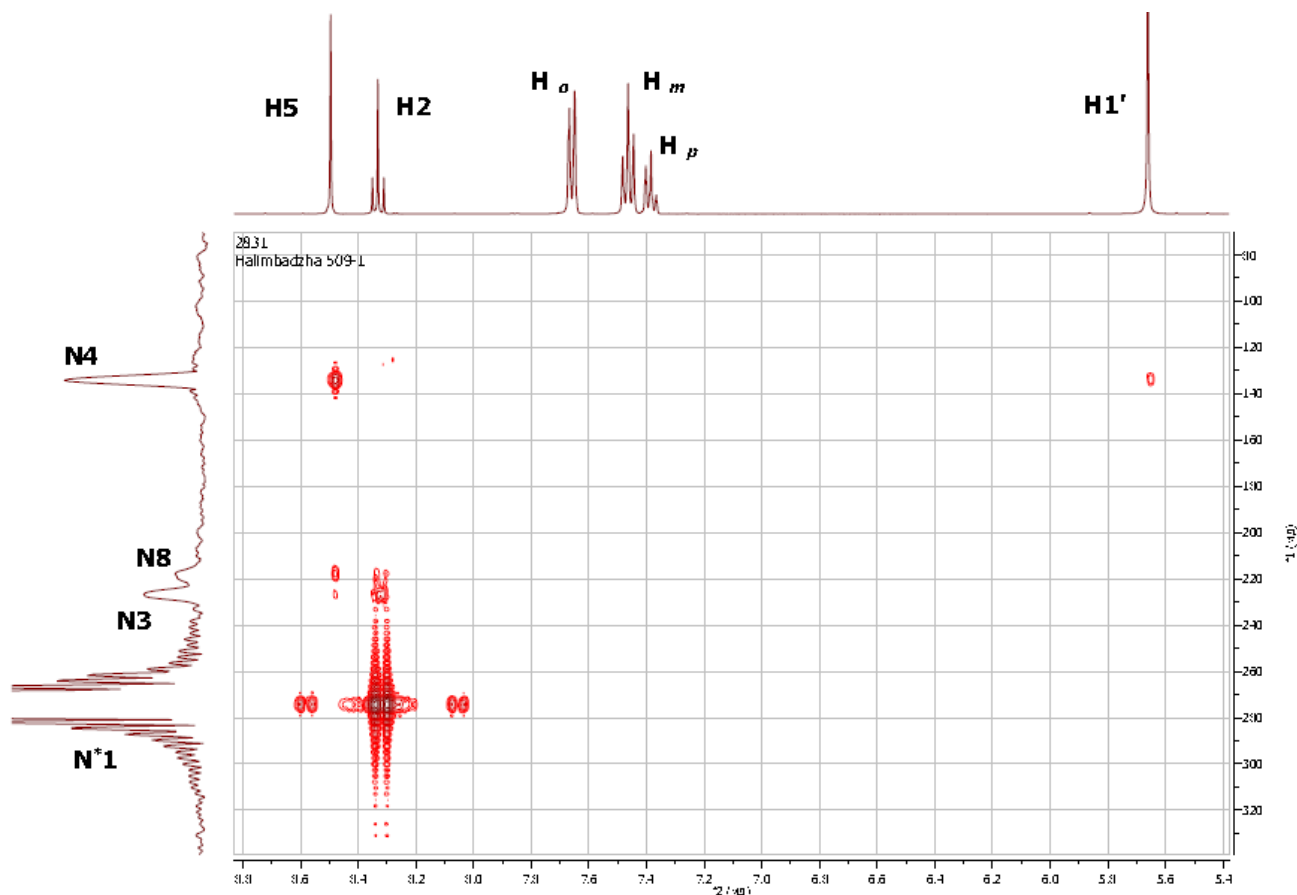


Рис 19. Фрагмент спектра 2D ^{15}N - ^1H HMBC соединения **40[#]** в растворе DMSO- d_6 (Bruke AVANCE II 400 МГц)

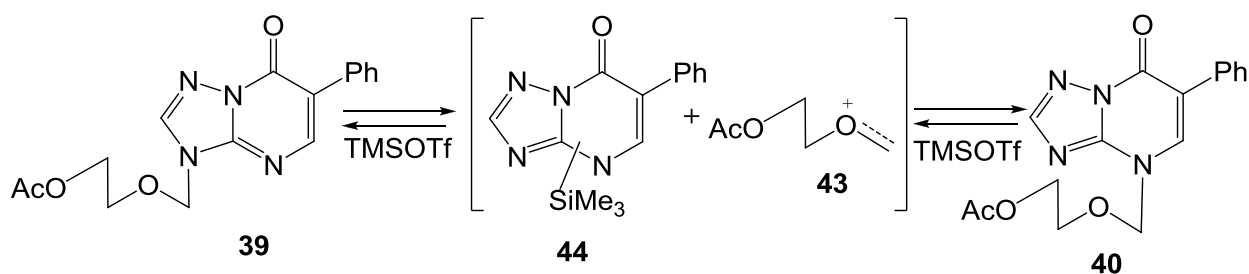


Схема 26

Таким образом, нами продемонстрировано, что константы гетероспинового взаимодействия ^{15}N - ^1H могут быть использованы в исследовании особенностей изомеризации N-алкильных производных 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-онов. Необходимо отметить, что введение изотопа ^{15}N значительно облегчает отнесение сигналов атомов азота в спектрах 2D ^{15}N - ^1H , что продемонстрировано на примере соединения **40[#]** (Рис 19). Использование данного 2D ЯМР спектра позволило однозначно определить положение ациклического фрагмента в соединении **40[#]**.

Для изучения особенностей комплексообразования азолазинов с мостиковым атомом азота был предпринят синтез [5- ^{15}N]-3-адамантил-6-пиридил-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7она **45*** (Схема 27). Выбор гетероциклического производного, содержащего в своей структуре одновременно пиридиновый и 1,2,4-триазиновый фрагменты обусловлен, тем что среди пиридил-1,2,4-триазинов найдены перспективны соединения, обладающие селективными комплексообразующими свойствами.

Синтез азолазина **45*** был осуществлен с использованием реакции азосочетания обогащенной соли диазония **46** с этиловым эфиром пиридилуксусной кислоты **47**. Последующая обработка NH-гетероцикла **48** 1-адамтанолом в концентрированной серной кислоте привела к соединению **45***.

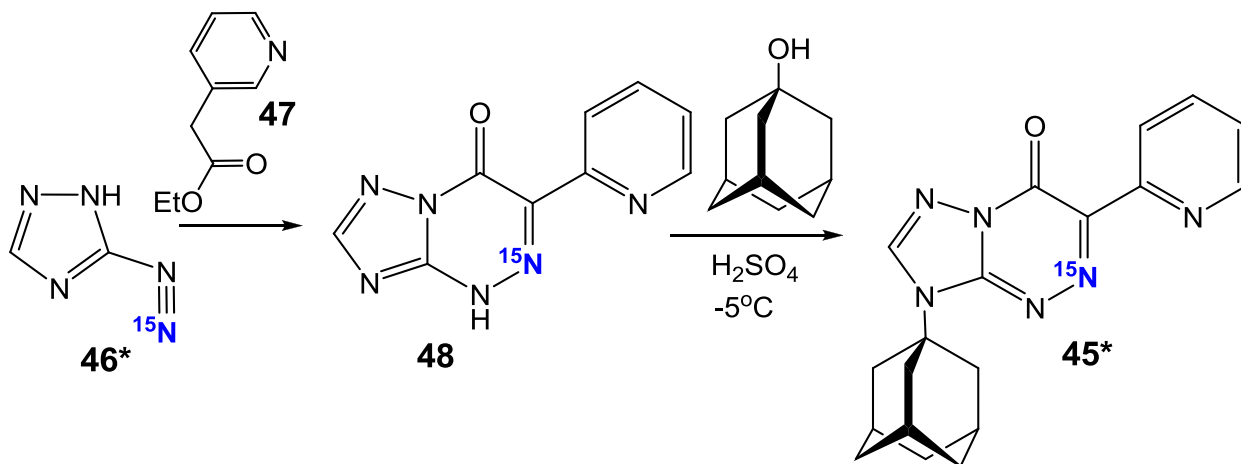


Схема 27

В спектре 1D ^1H ЯМР соединения **45*** присутствуют сигналы адамантильного и пиридильного фрагментов, а также синглет атома Н2. Присутствие в структуре **45*** изотопной метки подтверждается наличием КССВ ^{13}C - ^{15}N у сигналов С3а, С6 и углеродах пиридинового фрагмента (см. экспериментальную часть). В спектре 1D ^1H ^{15}N ЯМР сигнал атома $^{15}\text{N5}$ регистрировался виде синглета (см. экспериментальную часть). Место присоединение алкильного фрагмента в соединение **45*** подтверждено наличием кросс-пика в спектре 2D ^{13}C - ^1H НМВС между сигналами С1' адамантильного фрагмента и Н2.

Далее была осуществлена попытка зафиксировать методом ЯМР образование комплекса гетероцикла **45*** с цинком и установить его строение. Так, раствор соединения **45*** в DMF-d₆ был выдержан в течение 30 мин. с эквивалентом перхлората цинка. При этом нами в спектре ¹⁵N наблюдался сильнополюный сдвиг сигнала меченого атома азота, который имел значительное уширение, что подтверждает образование цинкового комплекса **49*** (Схема 27).

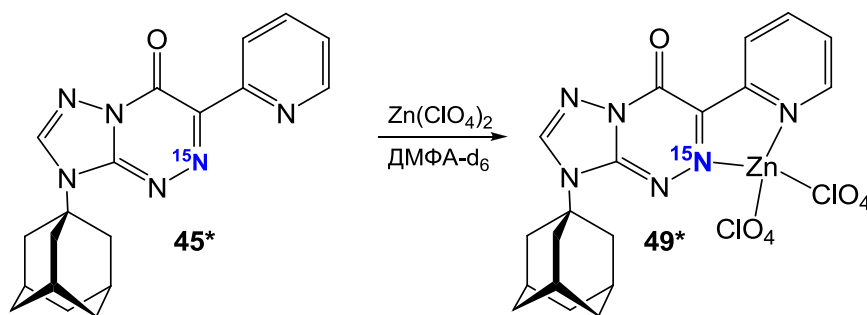


Схема 28

Однако уширение сигналов для большинства сигналов атомов углерода и появление дополнительных расщеплений, не связанных с гетероспиновым взаимодействием ¹³C-¹⁵N, не позволило измерить ⁿJ_{CN}-константы прямым методом, при этом их поведение также подтверждает образование комплекса. Тем не менее, нами показано, что обогащенные соединения могут быть использованы в дальнейшем для изучения строения комплексов с непарамагнитными металлами методом 1D ¹⁵N ЯМР.

Использование изотопномеченых соединений оказалось успешным в изучении химических трансформации тетразоло[1,5-*a*]пиримидинов. Ранее нами при выполнении второго этапа государственного контракта установлено, что взаимодействие 2-гидразинопиримидина **16** с обогащенной изотопом ¹⁵N азотистой кислотой, генерированной из K¹⁵NO₂ (¹⁵N, 86%) приводит к образованию смеси изомеров **17*aT** и **17*bT** в соотношении 5: 1, соответственно (Схема 8).

Одна из возможных причин образования смеси изомеров при взаимодействии ¹⁵N азотистой кислоты с 2-гидразинопиримидином **50***

является перегруппировка Димрота (Схема 29), поскольку азолазины по литературным данным склонны к данному типу трансформации [23, 24].

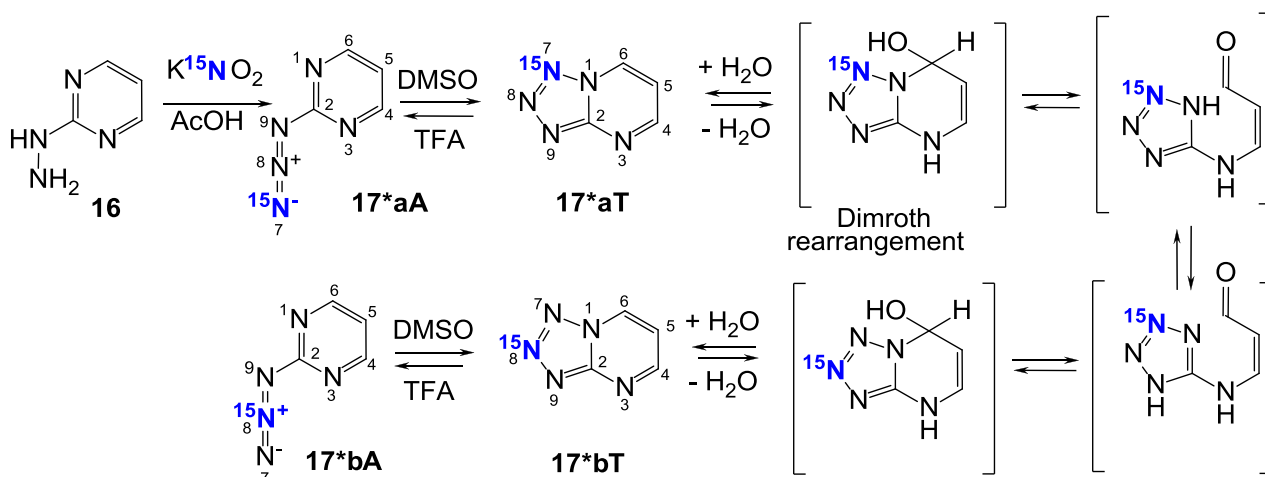


Схема 29

Для доказательства данной научной гипотезы было проведено исследование особенностей реакции между генерированной из $K^{15}NO_2$ азотистой кислотой и гетероциклом **17*aT**. Удалось установить, что сокращение времени реакции приводит к образованию единственного изотопомера **17*aT**, что подтверждают данные 1D ^{15}N ЯМР спектра, в котором фиксировался единственный синглет, соответствующий сигналу атома $^{15}N7$ (348.9 м.д.). При этом положении атома ^{15}N в тетразола[1,5-*a*]пиримидине **17*aT** данные КССВ ^{13}C - ^{15}N у атомов C2, C5 и C6.

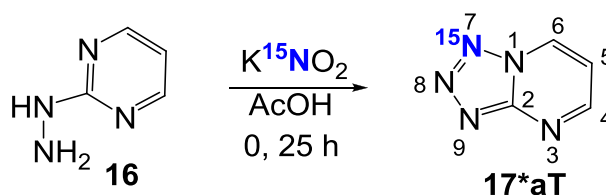


Схема 30

Далее кипячение соединения **17*aT** в 80% водной уксусной кислоте в течение 15 минут привело к образованию смеси изотопомеров **17*aT** и **17*bT** (Схема 30). Это однозначно, доказывает появление в спектре 1D ^{15}N ЯМР двух синглетов атомов $^{15}N7$ и $^{15}N8$ (348.9 м.д. и 403.0 м.д.).

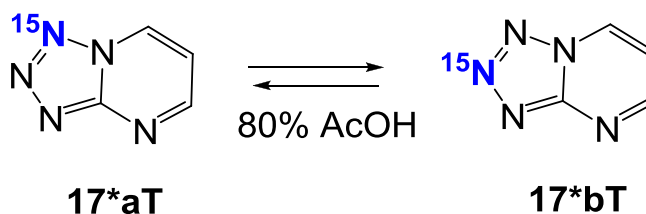


Схема 31

Полученный результат доказывает, что взаимодействие соединения **17*aT** с H^{15}NO_2 , полученной *in situ* из ^{15}N нитрата калия в кислой среде позволяет селективно вводить изотопную метку в азольный цикл тетразолоазинов, а одной из основных причин образование смеси изотопомеров является перегруппировка Димрота. Необходимо отметить, что описанный пример является первым случаем перегруппировки Димрота для тетразолопиримидинов.

3.5. ЭКСПЕРЕМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ЯМР-исследования соединения **19*T**, **20*T**, **23**T**, **32***- $^2\text{H}_3$** проведены на спектрометре AVANCE 700 фирмы BRUKER, укомплектованном датчиком тройного резонанса (^1H , ^{13}C , ^{15}N). Спектры ЯМР ^1H , ^{13}C и ^{15}N соединений **17*a,bT**, **37*В**, **30*T**, **31*T**, **39***, **40***, **45*** записаны на приборе «Bruker Avance II 400» в растворе DMCO-d_6 , внутренний стандарт ТМС (^{13}C , ^1H) и внешний стандарт жидкий аммиак (^{15}N).

Константы ССВ ^{13}C - ^{15}N были измерены, используя метод нелинейной аппроксимации форм линий в 1D ^{13}C спектрах, записанных с селективной развязкой от ^{15}N ядер и без нее [4]. Для селективной развязки ^{15}N использовались адиабатические импульсы (WURST-20) длиной 10-20 мс и с шириной диапазона инверсии ~ 1 кГц (14 м.д. для ^{15}N).

Масс-спектрометрическое исследование было выполнено на масс-спектрометре серии MicrOTOF-Q II фирмы Bruker Daltonics (Бремен, Германия), оснащённым электроспрем, источником ионизации, шестипортовым краном и устройством прямого ввода kd Scientific (скорость потока 180 мкл/час).

В качестве донора стабильных изотопов были использованы $K^{15}NO_3$ и $Na^{15}NO_2$ с изотопным обогащением 86 % и 98% производства Cambridge Isotope Laboratories, Inc (USA).

2-Гидразино-6-метилпиримидин-4-он 18 синтезирован по описанному ранее методу [25].

3-Гидразино-1,2,4-бензотриазин 21 был получен по описанному ранее методу [26].

[1- ^{15}N]-3-Амино-1,2,4-триазол 28* (^{15}N , 86%) получен по описанному ранее методу [27].

[1- ^{15}N]-7-Метилтетразоло[1,5-*a*]пиримидин-5-он 19*Т. К раствору 2-гидразино-6-метилпиримидин-4-она **18** (0.05 г, 0.36 ммоль) в AcOH (0.5 mL) прибавляли раствор $K^{15}NO_2$ (^{15}N , 86%) (0,034 г, 0.4 ммоль) в H_2O (0.5 mL). Реакционную массу перемешивали 0.5 ч и выпавший осадок [1- ^{15}N]-7-метилтетразоло[1,5-*a*]пиримидин-5-она отфильтровывали (0.028 г, 44%). Соединение в растворе $DMSO-d_6$ существует виде смеси циклических изомеров **19*Т** и **19*Т'**.

Бензо[*e*]тетразоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин 20*Т. К охлажденному до 8 °C раствору 3-гидразино-1,2,4-бензотриазина (0.05 г, 0.31 ммоль) в 0.8 mL AcOH прибавляли по каплям раствор $Na^{15}NO_2$ (^{15}N , 98%) в 0.125 mL H_2O . Затем реакционную массу перемешивали 0.3 ч, осадок отфильтровывали и сушили. Получали 0.03 г (выход 59%) бензо[*e*]тетразоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин.

[2,3- ^{15}N]-5-Аминотетразол моногидрат 21*. ^{15}N -Аминогуанидин гидрокарбонат **22*** (0.8 г, 5.88 ммоль) растворяли в 5 N HNO_3 (3 mL). К полученному раствору при температуре не выше 40 °C был добавлен [^{15}N]-натрия нитрит (0.50 g, 5.88 ммоль) в 7 mL H_2O . После добавления ацетат натрия (3 г) реакционную смесь кипятили 5 мин. и охлаждали. Выпавший осадок [2,3- ^{15}N]-5-Аминотетразол моногидрат **21*** отфильтровывали и сушили (0.24 г, 40 %).

[1,2- ^{15}N]-6-Фенил-5-метилтетразоло[1,5-*a*]пиримидин 23Т.** К уксусной кислоте 3 mL прибавляли [2,3- ^{15}N]-5-аминотетразола (0.045 г, 0.44

ммоль) 1-фенил-1,3-бутандионом (0.073 г, 0.44 ммоль). Реакционную массу кипятили 2 ч, охлаждали и выпавший осадок отфильтровывали. После перекристаллизации из этанола получали [1,2- ^{15}N]-6-фенил-5-метилтетразоло[1,5-*a*]пиримидин **23**Т** (0.025 г, 27%).

[1- ^{15}N]-7-Амино-6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин 30*. Раствор 2-амино-1,2,4-триазола **28*** (1.065 г, 12.5 ммоль) и 2-формилфенилацетонитрила **29** (1.817 г, 12.5 ммоль) в 7 mL ледяной уксусной кислоте кипятили 4 ч. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали 20 mL изопропилового спирта и сушили. Полученные [1- ^{15}N]-7-амино-6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин **30*** (1.952 г, 73%) использовался без дальнейшего очищения. ^{13}C ЯМР (DMSO-d_6) δ м.д: 7.42 (м, 1H, *H_p*-Ph), 7.50 (м, 4H, *H_m*-Ph+*H_o*-Ph), 7.89 (уш. с., 2H, NH_2), 8.28 (с, 1H, H5), 8.49 (д, 1H, H2, $^2J_{\text{NH}} = 16.0$ Гц). ^{13}C ЯМР (DMSO-d_6) δ м.д: 104.88 (C6 – сигнал уширен, присутствует расщепление связанное с КССВ ^{13}C - ^{15}N), 127.75 (*C_p*(Ph)), 129.10 (*C_m*(Ph)), 129.45 (*C_o*(Ph)), 133.26 (*C_i*(Ph)), 146.53 (C7, $J_{\text{CN}} = 4.0$ Гц), 154.04 (C5), 154.63 (C2, $J_{\text{CN}} = 3.6$ Гц), 154.72 (C3a). ^{15}N ЯМР (DMSO-d_6) δ м.д : 262.6

[1- ^{15}N]-6-Фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-он 31* . Раствор [1- ^{15}N]-7-амино-6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидина **30*** (1.679 г, 7.92 ммоль) в 8 мл 5 N HCl кипятили 4 ч. После добавления 4 мл 11 N HCl реакционную смесь кипятили 4 ч, охлаждали и выпавший осадок отфильтровывали. После перекристаллизации из ДМФА был получен [1- ^{15}N]-6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-он (1.02 г, 60%). ^1H ЯМР (DMSO-d_6) δ м.д: 7.34 (м, 1H, *H_p*-Ph), 7.42 (м, 2H, *H_m*-Ph), 7.66 (м, 2H, *H_o*-Ph), 8.22 (с, 1H, H5), 8.29 (д, 1H, H2, $^2J_{\text{NH}} = 16.0$ Гц). ^{13}C ЯМР (DMSO-d_6) δ м.д: 111.82 (C6 - сигнал уширен, присутствует расщепление связанное с КССВ ^{13}C - ^{15}N), 127.35 (*C_p*(Ph)), 128.21 (*C_m*(Ph)), 128.66 (*C_o*(Ph)), 133.33 (*C_i*(Ph)), 138.76 (C5), 150.08 (C3a), 152.26 (C2, $J_{\text{CN}} = 2.2$ Гц), 155.71 (C7, $J_{\text{CN}} = 3.7$ Гц). ^{15}N ЯМР (DMSO-d_6) δ м.д : 271.5.

[¹⁵N]-Изонитрозоацетоуксусный этиловый эфир (37B*). К смеси 3 мл (23.72 ммоль) ацетоуксусного эфира **35** и 4 мл AcOH при температуре 5-15 °С прибавляли раствор 1,8 г (25.71 ммоль) Na¹⁵NO₂ в 2.5 мл воды. Затем полученный раствор выдерживали 0.5 ч при температуре 15 °С и выливали в 60 мл смеси воды и льда. Полученную суспензию оставляли на ночь и экстрагировали несколькими порциями этилацетата (15 мл × 4). Экстракты объединяли и после упаривания органического растворителя получали 1.9 г остатка в виде масла, которое потом использовали без дальнейшей очистки для синтеза нитроуксусного эфира (**3-¹⁵N**). Выход [¹⁵N]-изонитрозоацетоуксусного эфира (**37B***) 51%. Данные ЯМР спектров приведены с учетом существования оксима **37B*** в растворе DMSO-d₆ в двух изомерных формах (*E/Z*). Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, δ, м.д.): 1.22 (т, 3H, OCH₂CH₃); 1.22 (т, 0.3H, OCH₂CH₃); 2.33 (с, 0.3H, CH₃); 2.33 (с, 3H, CH₃); 4.23 (к, 0.2H, OCH₂CH₃); 4.24 (к, 2H, OCH₂CH₃); 12.99 (уш. с, 0.1H N-OH); 13.25 (уш. с, 1H N-OH). Спектр ЯМР ¹⁵N (400 МГц, δ, м.д.): 401.31; 396.86. Масс-спектр, *m/z* (I%): [M+1] 161.05 (100).

[¹⁵N]-Нитроуксусный эфир (34*). К суспензии 1.9 г соединения **37B*** и 6 мл воды прибавляли раствор 3.1 г (10.40 ммоль) дигидрат бихромата натрия в смеси 7 мл воды и 2.5 мл конц. H₂SO₄. Затем реакционную массу перемешивали 1.5 ч, выливали в смесь 10 мл воды со льдом, а затем нагревали до комнатной температуры. Полученную суспензию обрабатывали несколькими порциями этилацетата (15 мл × 4). Экстракты объединяли, сушили безводным Na₂SO₄ и после упаривания получали 1 мл маслянистого остатка, который в дальнейшем использовали для синтеза натриевой соли **32***-²H₃** без дополнительной очистки. По данным ¹H ЯМР-спектроскопии остаток представляет собой смесь соединений **37B*** и **34*** в соотношении 1:3. Спектр ЯМР ¹H **34*** (400 МГц, δ, м.д.): 1.27 (т, 3H, OCH₂CH₃); 4.24 (к, 2H, OCH₂CH₃); 5.68 (д., 2H, CH₂, ²J_{NH} 2.0 Гц).

[²H₃, ¹⁵N₃]-2-Метилтио-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она (32***-²H₃**).** К суспензии 0.4 г (2.985 ммоль) амино-1,2,4-триазола **36*** в 3 мл воды,

добавляли 0.5 мл конц HCl, охлаждали до 0 °С и прибавляли по каплям раствор 210 мг (3 ммоль) Na¹⁵NO₂ в 3 мл воды. Затем реакционную массу перемешивали 10 мин и добавляли к охлажденной до 0 °С суспензии 7 мл 17% раствора Na₂CO₃ и 0.6 мл смеси соединений **34*** и **37В***, которая была получена выше. Образовавшуюся реакционную массу перемешивали 2 ч при комнатной температуре, выпавший осадок отфильтровывали и кристаллизовали из 50% водной уксусной кислоты. Получено 0.45 г натриевой соли **32***-²H₃** в виде дигидрата. Выход 51 %, т. пл > 300 °С. Масс-спектр *m/z* (I%): [M-Na+1] 234.03 (100); [M-Na+2] 235.04 (8,1); [M-Na+3] 236.02 (4,8);

3-(2-Ацетоксиэтокси)метил-6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **39 и 4-(2-Ацетоксиэтокси)метил-6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **40**.**

Метод А. К суспензии 6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **31** (0.5 г 2.36 ммоль) в 10 mL абсолютного ацетонитрила добавляют TMSOTf (1.32 mL, 5.568 ммоль) и (2-ацетоксиэтил)-метилацетата **38** (0,414 г, 2.36 ммоль). Реакционную массу перемешивают 0.25 ч и выливают в 35 мл 5 % водного раствора NaHCO₃. Полученную суспензию обрабатывают CHCl₃ (3×20 mL), органический слой отделяют и упаривают. Из полученного остатка методом колоночной хроматографии выделяют 3-(2-ацетоксиэтокси)метил-6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **39** (0.25 г, 32%) и 4-(2-ацетоксиэтокси)метил-6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **40** (0.10 г, 12%).

Метод В. К суспензии 6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **31** (0.5 г 2.36 ммоль) в 10 mL абсолютного ацетонитрила добавляют TMSOTf (1.32 mL, 5.568 ммоль) и (2-ацетоксиэтил)-метилацетата **38** (0,414 г, 2.36 ммоль). Реакционную массу перемешивают 0.25 ч и выливают в 35 мл 5 % водного раствора NaHCO₃. Полученную суспензию обрабатывают CHCl₃ (3×20 mL), органический слой отделяют и упаривают. Из полученного остатка методом колоночной хроматографии выделяют 3-(2-

ацетоксиэтокси)метил-6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **39** (0.12 г, 15%) и 4-(2-ацетоксиэтокси)метил-6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **40** (0.19 г, 24%).

Изомеризация 3-(2-ацетоксиэтокси)метил-6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **39/4-(2-ацетоксиэтокси)метил-6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **40** в присутствии [1-¹⁵N]-6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она (¹⁵N, 86%).**

К суспензии [¹⁵N]-6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **31*** (0.198 г, 0.930 ммоль)/(0.040 г, 0.188 ммоль) в 10/3 mL абсолютного ацетонитрила прибавляли TMSOTf (0.33 mL, 1.86 ммоль,)/(0.66 mL 0.376 ммоль) и смесь перемешивали 0.5 ч. К полученному раствору прибавляли 3-(2-ацетоксиэтокси)метил-6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-он **39**/4-(2-ацетоксиэтокси)метил-6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-он **40** (0.305 г, 0.930 ммоль)/(0.061 г, 0.188 ммоль,). Реакционную смесь перемешивали в течение 30 дней при комнатной температуре и выливали в 10/5 mL 10% раствор Na₂CO₃. Полученную суспензию обрабатывали CHCl₃ (3× 10 mL)/(5× 10 mL) органический слой отделяли и упаривали. Из остатка методом колоночной хроматографии были выделены [1-¹⁵N]-4-(2-ацетоксиэтокси)метил-6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-он **40[#]** (¹⁵N, ≈43%) (0.119 г 39%)/(0.020 г, 32%) и [1-¹⁵N]-3-(2-ацетоксиэтокси)метил-6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-он **39[#]** (¹⁵N, ≈43%) (0.099 г, 32%)/(0.014 г, 22%). Элюент генсан/АсОEt 1:1→2:1. При подкислении водного слоя был получен [1-¹⁵N]-6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-он **31[#]** (¹⁵N, ≈43%) (0.160 г, 81%)/(0.026 г, 65%).

[5-¹⁵N]-6-Пиридил-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он **48*.** К суспензии 3-амино-1,2,4-триазола (1 г, 11.90 ммоль) в 5 mL H₂O прибавляли 2 мл 14 N HNO₃, полученный раствор охлаждали до -5 °С. Затем по каплям прибавляли раствор K¹⁵NO₂ (¹⁵N, 86 %) (1 г, 11.90 ммоль) в 3 mL H₂O при температуре -5 °С и перешивали 0.15 ч. После этого, полученную суспензию прибавляют к смеси 20 mL 30% водного раствора AcONa и этилового эфира

2-пиридилуксусной кислоты **47** (1,83 г 11.09 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 3 ч, отфильтровывали и осадок растворяли в 45 mL ДМФА. Полученный раствор кипятили 0.5 ч и охлаждали. Выпавший осадок отфильтровывали и сушили. Полученный [5-¹⁵N]-6-пиридил-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-он **48*** (1.19 г, 50%) использовали далее без дополнительной очистки.

[5-¹⁵N]-3-Адамантил-6-пиридил-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-он 45*. К охлажденному до -10 °С раствору [5-¹⁵N]-6-пиридил-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-он **48*** (0.5 г, 2.32 ммоль) в 5 mL концентрированной H₂SO₄ прибавляли 1-адамантанол (0.353 г, 2.32 ммоль). Реакционную массу перемешивали при -5 °С 0.5 ч и выливают в 100 mL H₂O, затем нейтрализовали AcONa, выпавший осадок отфильтровывали. Перекристаллизация из изопропилового спирта позволяет получить [5-¹⁵N]-3-адамантил-6-пиридил-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-он (0.283 г, 35%).

¹H ЯМР (DMF-d₆) δ м.д: 2.02 (м, 6H, Ad), 2.46 (м, 3H, Ad), 3.02 (м, 6H, Ad), 7.60 (м, 1H, C₅H₄), 8.10 (м, 1H, C₅H₄), 8.19 (м, 1H, C₅H₄), 8.90 (м, 1H, C₅H₄), 9.26 (с, 1H H₂). ¹³C ЯМР (DMF-d₆) δ м.д: 18.5 (Ad), 26.1 (Ad), 60.11 (C1'-Ad), 123.62 (Py), 124.45 (Py), 136.37 (Py), 141.88 (C2), 146.54 (C6, J_{CN} 4.80 Гц), 147.48 (C7), 148.94 (C3a, J_{CN} 1.6 Гц), 149.51 (Py), 153.89 (Py, J_{CN} 8.82 Гц). ¹⁵N ЯМР (DMF-d₆) δ м.д: 397.1

Исследование комплексообразования соединения 48*. Растворяли 0.025 г (0.073 ммоль) соединения **48*** в 0.5 mL DMF-d₇, регистрировали спектры ¹H, ¹³C и ¹⁵N (Синтез соединения **48***). К полученному раствору добавляли Zn(ClO₄)₂·6H₂O 0.026 г (0.073 ммоль), регистрировали спектры ¹H, ¹³C и ¹⁵N.

¹H ЯМР (DMF-d₆) δ м.д: 1.58 (м, 3H, Ad), 1.60 (м, 3H, Ad), 2.10 (м, 6H, Ad), 8.03 (м, 1H, C₅H₄), 8.54 (м, 1H, C₅H₄), 9.20 (м, 1H, C₅H₄), 9.31 (м, 1H, C₅H₄), 9.23 (с, 1H H₂). ¹³C ЯМР (DMF-d₆) δ м.д: 20.5 (Ad), 29.4 (Ad), 61.43 (C1'-Ad), 124.99 (Py), 126.89 (Py), 137.90 (Py), 141.31 (C2), 141.31 (C6), 147.07

(C7), 148.35 (C3a), 149.42 (Py), 149.99 (Py) (сигналы уширены и смещены, КССВ 15N-1H не диагностируются). ¹⁵N ЯМР (DMF-d₆) δ м.д: 342.3

[1-¹⁵N]-тетразоло[1,5-*a*]пиримидин 17*аТ. К раствору 0.05 г (0.045 ммоль) гидразинопиримидина **16** в 5 мл 80% уксусной кислоты при 5 °С добавляли раствор 0.07 г KNO₂ в 1 мл воды. Затем реакционную массу перемешивали при комнатной температуре 0.1 ч и обрабатывать 10 мл этилацетата. Органический слой отделяли и упаривали. Выход 0.024 г (46 %) смеси соединения **17*аТ**, М+ 122. 154.91 ¹³C ЯМР (DMF-d₆) δ м.д: 20.5 (C2, *J* ¹³C-¹⁵N7 2.5 Гц), 160.25 (C4), 113.74 (C5 *J* ¹³C-¹⁵N7 1.11 Гц), 35.51 (C6, *J* ¹³C-¹⁵N7 3.8 Гц).

Перегруппировка Димрота соединения 17*аТ в 17*бТ. К 0.024 г соединения **17*аТ** прибавляли 2 мл 80% уксусной кислоты и реакционную массу кипятили 0.2 ч. Затем упаривали, получали остаток, содержащий смесь тетразоло[1,5-*a*]пиримидинов **17*аТ** и **17*бТ** в соотношении 5 : 1, соответственно. Соотношение определено по данным спектра 1D ¹⁵N ЯМР. Физикохимические характеристики смеси соединений **17*аТ** и **17*бТ** указаны в отчете по этапу I проекта

Рентгеноструктурный анализ соединения 19Т проводили на автоматическом дифрактометре «Xcalibur 3» с CCD-детектором (ω/2θ-сканирование, Mo-K_α излучение, графитовый монохроматор) по стандартной процедуре.

Структура расшифрована прямым методом и уточнены МНК по программам SHELXS-97 [28] и SHELXL-97 [29] в анизотропном (изотропном для атомов Н) приближении. Поправка на поглощение не вводилась ввиду её малости.

4. ОТЧЕТ ОБ ОБОБЩЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1. АНАЛИЗ КССВ ^{13}C - ^{15}N , КАК СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД В ИССЛЕДОВАНИИ СТРОЕНИЯ И ПРЕВРАЩЕНИ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ГЕТЕРОЦИКЛОВ

Одним из основных результатов, который получен при выполнении данного государственного контракта является создание нового метода изучения особенностей строения конденсированных азотсодержащих гетероциклов на основе констант спин-спинового взаимодействия ^{13}C - ^{15}N с малой амплитудой 1D ^{13}C ЯМР спектрах. С этой целью разработаны подходы анализа $^nJ_{\text{CN}}$ -констант. В основе первого способа лежит деконволюция спектральных линий в 1D ^{13}C ЯМР спектрах исследуемых соединений. Для увеличения точности измерения КССВ одновременно обрабатывались несколько 1D ^{13}C ЯМР спектров, накопленных без развязки от ядер ^{15}N и с селективной развязкой от ядер ^{15}N (двух спектров в случае образования смеси изотопомеров). Второй подход, использованный для измерения гетероядерных констант спин-спинового взаимодействия ^{13}C - ^{15}N , был основан на методе амплитудно-модулированного спинового эха. Для измерения КССВ были получены 1D ^{13}C «спин-эхо» эксперименты, как с селективной инверсией ядер ^{15}N , так и без нее. При этом величины констант спин-спинового взаимодействия ^{13}C - ^{15}N , измеренные двумя независимыми методами оказались практически одинаковыми. Использование данного подхода значительно расширяет методы ядерного магнитного резонанса, как инструмента в исследовании строения полиазотистых гетероциклов и их химических трансформаций. Эффективность нового разработанного подхода продемонстрирована на примере исследования азидо-тетразольного равновесия тетразоло-1,2,4-триазинов, тетразоло[1,5-*a*]пиримидинов и в изучение строения 1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов и 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинов. Кроме того, показано, что константы ССВ ^{13}C - ^{15}N могут быть использованы эффективно самостоятельно, а также в комплексном

подходе совместно с данными спектров 1D ^{15}N и 2D корреляционными экспериментами ^{15}N - ^1H .

Проведение сравнения нового метода исследования строения азотсодержащих гетероциклов с методом рентгеноструктурного анализа, показала, что использование КССВ ^{13}C - ^{15}N имеет значительные преимущества. Это вывод подтверждают данные, полученные при анализе ранее описанных в литературе структур. В результате нами было установлено, что производные тетразоло[1,5-*b*][1,2,4]триазинов (ПТ) представлены, как соединения (ПТ') со способом аннелирования тетразольного и триазинового циклов [5,1-*c*]. Нам удалось установить и устранить эти ошибки.

Более того, необходимо отметить, что метод ЯМР позволяет исследовать особенности строения в растворах, а именно, в условиях, в которых протекает большинство химических и биологических реакции. Этот метод позволяет исследовать не только индивидуальные соединения, но и сложные смеси. Поэтому развитие этого подхода важно для прямого наблюдения за химическими и биологическими превращениями.

Так, нам удалось в первые, установить факт перегруппировки Димрота в ряду тетразоло[1,5-*a*]пиримидинов, а также исследования реакцию гликлозилирования в ряду 6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-онов в условиях реакции Форбрюггена.

Таким образом, анализ КССВ ^{13}C - ^{15}N является высокоэффективным, современным методом исследования строения полиазотистых конденсированных гетероциклов и его широкое использование исследователями позволит получать более точную информацию о строении данного класса соединений и избежать в дальнейшем ошибок в научных работах.

Полученные результаты могут быть использованы в курсе «ЯМР-спектроскопия» по подготовке студентов магистратуры направления 240100 «Химическая технология и биотехнология» по циклу «Комплексное физическое и химическое исследование и экспертная оценка органических

материалов» и при разработке курсов повышения квалификации для преподавателей высших учебных заведений и для магистров, изучающих синтез и строение гетероциклических соединений.

4.2. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ НИР В РЕАЛЬНОМ СЕКТОРЕ ЭКОНОМИКИ

Успешное использование гетероспиновых констант ^{13}C - ^{15}N невозможно без разработки методов синтеза ^{15}N изотопномеченых соединений. При реализации данного проекта нами были разработаны и проверены эффективные методы включения стабильных изотопов в различные азолазины, исходя из простых соединений, обогащенных изотопом ^{15}N . Ценность разработанных подходов заключается в их общности, что продемонстрировано на примере получения меченого изотопами ^2H и ^{15}N противовирусного препарата нового поколения «триазавирин». Необходимо отметить, что наблюдается появление лекарственных препаратов, основу которых составляют азолазины. Так, заканчивается разработка противовирусного средства «триазавирин», который является производным 1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов. На фармацевтическом рынке уже присутствуют пиразоло[1,5-а]пиримидины (анданте, залеплон), которые используются как седативные средства. Таким образом, в ближайшее время будет наблюдаться рост в потребности меченых стабильными изотопами биологически активных азолазинов с целью их использовании в анализе метаболических превращений и фармакокинетики. Кроме того, изотопномеченые соединения могут быть использованы в процессе анализа чистоты лекарственных препаратов при их выпуске. Разработанные нами в ходе выполнения государственного контракта схемы синтеза введения изотопа ^{15}N позволят разработать современные методики оценки качества лекарственных препаратов на основе ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

5. ПУБЛИКАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НИР

5.1. ЗАКЛЮЧЕНИЕ ЭКСПЕРТНОЙ КОМИССИИ ПО ОТКРЫТОМУ ОПУБЛИКОВАНИЮ



Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования

**«Уральский федеральный университет
имени первого Президента России Б.Н.Ельцина»**
(УрФУ)

ул. Мира, 19, Екатеринбург, 620002 тел.: (343) 374-03-62 факс: (343) 374-38-84

e-mail: rector@mail.ustu.ru <http://www.ustu.ru>

ОКПО 02069208, ОГРН 1026604939855, ИНН/КПП 6660003190/667001001

28.01.2011 № 23.02.29/28
На № _____ от _____



УТВЕРЖДАЮ
Заместитель проректора
по науке УрФУ С.В. Устелемов

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

о степени секретности сведений, содержащихся в статье «Синтез изотопномеченного [$^2\text{H}_3$, $^{15}\text{N}_3$]-триазавирина» авторы Т.С. Шестакова, И.А. Халымбаджа, С.Л. Деев, О.С. Ельцов, В.Л. Русинов, З.О. Шенкарев, А.С. Арсеньев, О.Н. Чупахин.

Комиссия в составе: председателя, заведующего кафедрой ТОС, д.х.н. Мокрушина В.С., эксперта, заведующего кафедрой физической и коллоидной химии, д.х.н. Маркова В.Ф., начальника первого отдела Гранина А.Ю. рассмотрела статью «Синтез изотопномеченного [$^2\text{H}_3$, $^{15}\text{N}_3$]-триазавирина» авторы Т.С. Шестакова, И.А. Халымбаджа, С.Л. Деев, О.С. Ельцов, В.Л. Русинов, З.О. Шенкарев, А.С. Арсеньев, О.Н. Чупахин, на предмет определения степени секретности содержащихся в них сведений.

РУКОВОДСТВУЯСЬ:

Законом РФ «О государственной тайне»; «Перечнем сведений, отнесенных к государственной тайне», утвержденным Указом Президента Российской Федерации от 30.11.95 г. № 1203 с последующими изменениями и дополнениями; «Правилами отнесения сведений», составляющих государственную тайну, к различным степеням секретности, утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 04.09.94 г. № 870; «Перечнем сведений, подлежащих засекречиванию» Министерства образования Российской Федерации, 2007 г.; Руководством по защите информации, содержащей государственную тайну, от технических разведок и от утечки по техническим каналам на объекте ФГАОУ ВПО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

КОМИССИЯ УСТАНОВИЛА: сведения, содержащиеся в статье «Синтез изотопномеченного [$^2\text{H}_3$, $^{15}\text{N}_3$]-триазавирина» авторы Т.С. Шестакова, И.А. Халымбаджа, С.Л. Деев, О.С. Ельцов, В.Л. Русинов, З.О. Шенкарев, А.С. Арсеньев, О.Н. Чупахин, не попадают под действие Закона «О государственной тайне», не составляют государственную тайну в соответствии с «Перечнем сведений, подлежащих засекречиванию» Министерства образования Российской Федерации и не имеют степени секретности.

ВЫВОД: в статье «Синтез изотопномеченного [$^2\text{H}_3$, $^{15}\text{N}_3$]-триазавирина» авторы Т.С. Шестакова, И.А. Халымбаджа, С.Л. Деев, О.С. Ельцов, В.Л. Русинов, З.О. Шенкарев, А.С. Арсеньев, О.Н. Чупахин, не содержатся сведения, составляющие государственную тайну. Информация может быть опубликована в открытой печати.

Председатель комиссии
Члены комиссии:

В.С. Мокрушин
В.Ф. Марков
А.Ю. Гранин

5.2. КОПИИ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ ВАК ИЛИ ЗАРУБЕЖНОМ ЖУРНАЛЕ С ОБЯЗАТЕЛЬНОЙ ССЫЛКОЙ НА ПРОВЕДЕНИЕ НИР В РАМКАХ РЕАЛИЗАЦИИ ФЦП «НАУЧНЫЕ И НАУЧНО-ПЕДАГОГИЧЕСКИЕ КАДРЫ ИННОВАЦИОННОЙ РОССИИ» НА 2009-2013 ГОДЫ

714

ISSN 0002-3353

Известия Академии наук. Серия химическая, 2011, № 4

УДК 547.527

Синтез противовирусного препарата «триазавирин» меченного изотопами ^2H и ^{15}N *

Т. С. Шестакова,^а И. А. Халымбаджа,^а С. Л. Деев,^{а*} О. С. Ельцов,^а
В. Л. Русинов,^{а,б} З. О. Шенкарев,^а А. С. Арсеньев,^а О. Н. Чупахин^{а,б}

^аУральский федеральный университет,
Российская Федерация, 620002 Екатеринбург, ул. Мира, 19.
Факс: (343) 374 0458. E-mail: deevsl@yandex.ru

^бИнститут органического синтеза им. И. Я. Постовского,
Российская Федерация, 620041 Екатеринбург, ул. С. Ковалевской, 22.
Факс: (343) 374 1189. E-mail: chupakhin@ios.uran.ru

^аИнститут биоорганической химии
им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук,
Российская Федерация, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.
Факс: (495) 335 5033. E-mail: zh@nmr.ru; aars@nmr.ru

Разработаны селективные методы включения стабильных изотопов ^{15}N и ^2H в структуру противовирусного препарата «триазавирин» 1. Синтезирован изотопно-модифицированный «триазавирин» $1\text{-}^2\text{H}_3,^{15}\text{N}_3$, содержащий меченые атомы как в азольном, так и в азиновом циклах. Исследованы особенности спектров ЯМР ^{13}C и ^{15}N изотопомеченного образца $1\text{-}^2\text{H}_3,^{15}\text{N}_3$.

Ключевые слова: соль диазония, азосочетание, триазавирин, меченный изотопами ^2H и ^{15}N , спектры ЯМР.

Включение стабильных изотопов (^2H , ^{13}C , ^{15}N) в структуру биологически активных соединений используется как эффективный подход для создания способов их детектирования методами масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии. Применение этого метода позволяет изучать фармакокинетику и пути метаболизма лекарственных препаратов^{1–5}.

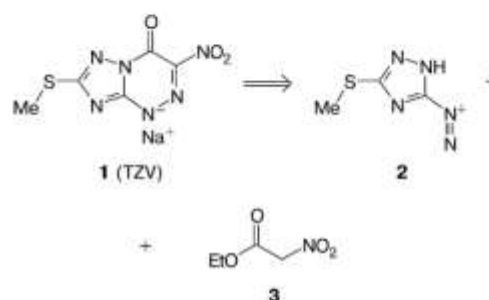
Производные 6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-[1,2,4]триазин-7-онов относятся к новому классу соединений, обладающих противовирусной активностью^{6,7}. Особое место в этом ряду занимает препарат «триазавирин» 1 (TZV), проходящий вторую фазу клинических испытаний и эффективный в отношении различных штаммов вируса гриппа, включая штаммы H5N1 (вирус гриппа птиц)^{8–10}.

Целью данного исследования является разработка метода синтеза соединения 1, содержащего стабильные изотопы ^{15}N и ^2H в азольном и в азиновом циклах.

Схема синтеза натриевой соли 1 основана на реакции азосочетания соли диазония 2 с нитроуксусным эфиром 3 (схема 1)⁸. Соединение 2 получают из 3-амино-5-метилтно-1,2,4-триазола и азотистой кислоты. При этом соль диазония не выделяют в чистом виде, а используют в виде раствора. Таким образом, включение атомов ^{15}N и ^2H в структуру соединений 2 и 3 позволит получить меченый TZV.

* Посвящается академику РАН В. Н. Чарушину в связи с его 60-летием.

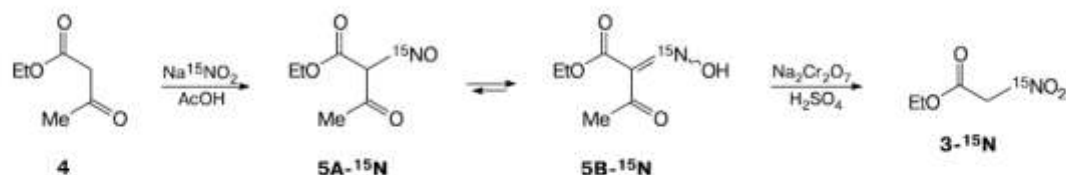
Схема 1



В качестве донора изотопа ^{15}N для синтеза меченого этилнитроацетата 3 был выбран обогащенный нитрит натрия (^{15}N , 98%), который при взаимодействии с ацетоуксусным эфиром в среде уксусной кислоты (схема 2) образовывал нитрозопроизводное $5\text{-}^{15}\text{N}$, существующее в растворе DMSO-d_6 в виде оксима $5\text{B-}^{15}\text{N}$.

Необходимо отметить, что соединение $5\text{B-}^{15}\text{N}$ регистрируется в виде смеси *E*- и *Z*-изомеров в соотношении 10:1. Этот вывод о строении оксима $5\text{B-}^{15}\text{N}$ сделан на основании данных спектроскопии ЯМР ^1H и ^{15}N . В спектре ЯМР ^{15}N соединения $5\text{B-}^{15}\text{N}$ наблюдалось два сигнала ядер ^{15}N δ 401.31 м.д. и δ 396.86 м.д., а в спектре ЯМР ^1H присутствовало два сигнала с δ 13.25 м.д. и δ 12.99 м.д., соответствующих

Схема 2



ОН-группам. В то же время однозначное отнесение сигналов в спектрах ЯМР ^{15}N и ^1H соединения 5B- ^{15}N к изомерным формам *E* и *Z* не проводилось. Последующая обработка соединения 5- ^{15}N бихроматом натрия позволила синтезировать меченый нитроуксусный эфир 3- ^{15}N . Анализ методом ЯМР ^1H показал, что в результате реакции окисления нами была получена смесь соединений 3- ^{15}N и 5B- ^{15}N в соотношении 3 : 1 соответственно. В последующем эта смесь была использована в реакции азосочетания без дополнительной очистки. Образование соединения 3- ^{15}N подтверждалось наличием в спектре ЯМР ^1H дополнительного расщепления у сигнала метиленовой группы (CH_2), возникающего в результате спин-спинового взаимодействия с ядром ^{15}N ($^2J_{\text{H,N}} = 2.0$ Гц).

Для введения изотопа ^{15}N в азольный цикл соли диазония 2 нами разработана схема синтеза, основанная на использовании амингуанидина 6- ^{15}N (обогащение по ^{15}N 86%) (схема 3). При обработке соединения 6- ^{15}N роданистым аммонием образовывался тиауразол 7- ^{15}N . Положение изотопной метки в соединении 7- ^{15}N определено схемой синтеза. На следующем этапе получения изотопно-модифицированной соли диазония 2 было проведено селективное включение атомов ^2H с помощью реакции алкилирования триазола 7- ^{15}N дейтерированным подиастым метилом (^2H , 98%). В результате было получено соединение 8- $^2\text{H}_3$, ^{15}N с выходом 63%. Нали-

чие изотопных меток в данном случае было подтверждено данными масс-спектрометрии ($[\text{M} + \text{H}]^+$ 135.05). Кроме того, в спектре ЯМР ^{15}N соединения 8- $^2\text{H}_3$, ^{15}N регистрировался сигнал атома N(1), имеющий вид синглета (δ 262.70 м.д.). Дальнейшее превращение гетарилламина 8- $^2\text{H}_3$, ^{15}N в соль диазония 2- $^2\text{H}_3$, $^{15}\text{N}_2$ происходило под действием ^{15}N -азотистой кислоты, генерированной из $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ (обогащение по ^{15}N 98%) в кислой среде. Использование ^{15}N -меченной азотистой кислоты в процессе диазотирования амина 8- $^2\text{H}_3$, ^{15}N привело к введению дополнительной метки ^{15}N в структуру 2.

Такой прием введения изотопа ^{15}N в соль диазония 1,2,4-триазолов, важных синтонов для получения различных производных 1,2,4-триазоло[5,1-*c*]-[1,2,4]триазинов, описан нами ранее¹¹. Именно этот подход по включению изотопа ^{15}N в положение 5 конденсированных 1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов был использован для синтеза изотопомеченного TZV, содержащего одну метку ^{15}N (5) (натриевая соль [5- ^{15}N]-2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-она (^{15}N -TZV)) (схема 4).

Проведение реакции сочетания между солью диазония 2- $^2\text{H}_3$, $^{15}\text{N}_2$ и нитроуксусным эфиром 3- ^{15}N в присутствии раствора карбоната натрия позволило синтезировать обогащенный изотопами ^{15}N и ^2H противоязвирный препарат «триазавирин» 1- $^2\text{H}_3$, $^{15}\text{N}_3$ (см. схему 4).

Схема 3

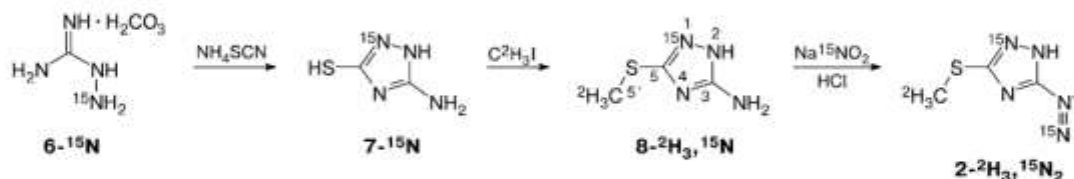
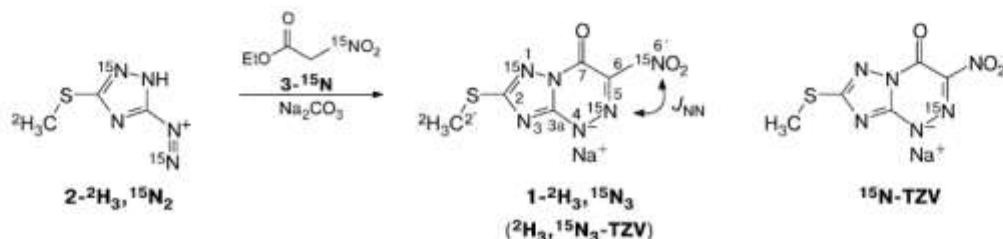


Схема 4



В спектре ЯМР ^{15}N соединения $1\text{-}^2\text{H}_3\text{,}^{15}\text{N}_3$ сигналы атомов N(5) и N(6') регистрируются в виде дублетов с КССВ $^2J_{\text{N,N}} = 6.3$ Гц, а сигнал атома N(1) имеет вид синглета (табл. 1). Такая спектральная картина подтверждает присутствие трех изотопных меток ^{15}N в соединении $1\text{-}^2\text{H}_3\text{,}^{15}\text{N}_3$. Отнесение сигналов атомов азота изотопомеченного «триазавирина» ($^2\text{H}_3\text{,}^{15}\text{N}_3\text{-TZV}$) было проведено с учетом мультиплетности сигналов, а также на основании значения химического сдвига $^{15}\text{N}(5)$ (δ 397.20 м.д.) меченого $^{15}\text{N}\text{-TZV}$ (см. лит.¹¹). Присутствие атомов ^{15}N в структуре соединения $1\text{-}^2\text{H}_3\text{,}^{15}\text{N}_3$ приводит к появлению гетероядерных констант ССВ $^{13}\text{C}\text{-}^{15}\text{N}$ у сигналов атомов углерода C(2), C(3a), C(6) и C(7) (см. табл. 1). Кроме того, в углеродном спектре для сигналов атомов C(2') и C(2) наблюдается дополнительная мультиплетная составляющая, связанная с наличием спин-спинового взаимодействия $^2\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$. Измерение КССВ $^{13}\text{C}\text{-}^{15}\text{N}$ проведено на основании 1D- ^{13}C -ЯМР-экспериментов, зарегистрированных с селективной развязкой от ядер ^{15}N . Полученные результаты доказывают селективное включение в структуру TZV трех изотопных меток ^{15}N . Кроме того, наличие констант спин-спинового взаимодействия у сигналов C(6) и C(7) с атомом N(1) подтверждает способ аннелирования [5,1-с] между азольным и азиновым фрагментами в гетероцикле 1.

Таким образом, нами разработаны методы селективного включения изотопов ^{15}N и ^2H в различные положения натриевой соли 1. Получен изотопомеченный противоязвенный препарат «триазавирин» $1\text{-}^2\text{H}_3\text{,}^{15}\text{N}_3$ с высоким содержанием атомов ^{15}N и ^2H , который может быть использован как внутренний стандарт в исследованиях фармакокинетики препарата «триазавирин» методом масс-спектрометрии. Исследованы характеристики спектров ЯМР ^{13}C и ^{15}N соединения $1\text{-}^2\text{H}_3\text{,}^{15}\text{N}_3$.

Таблица 1. Данные спектров ЯМР ^{13}C и ^{15}N соединения $1\text{-}^2\text{H}_3\text{,}^{15}\text{N}_3$

^{13}C		^{15}N	
Атом	δ, м.д., J/Гц	Атом	δ, м.д., J/Гц
C(2')	13.40*	N(1)	259.91
	($^1J_{\text{C,D}} = 21$)		
C(2)	166.33*	N(5)	397.18
	($^2J_{\text{C,N(1)}} = 5.1$, $^3J_{\text{C,D}} = 0.7$)		($^2J_{\text{N,N}} = 6.3$)
C(3a)	160.70	N(6')	368.42
	($^2J_{\text{C,N(5)}} = 2.1$, $^2J_{\text{C,N(1)}} = 0.4$)		($^2J_{\text{N,N}} = 6.3$)
C(6)	145.15		
	($^1J_{\text{C,N(5)}} = 1.8$, $^1J_{\text{C,N(6')}} = 23.4$, $^3J_{\text{C,N(1)}} = 1.4$)		
C(7)	143.43		
	($^2J_{\text{C,N(5)}} = 1.3$, $^2J_{\text{C,N(6')}} = 5.3$, $^2J_{\text{C,N(1)}} = 3.3$)		

* Сигналы содержат дополнительную мультиплетную составляющую в результате спин-спинового взаимодействия $^2\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ^1H , ^{13}C и ^{15}N соединений $5\text{B}\text{-}^{15}\text{N}$, $3\text{-}^{15}\text{N}$, $7\text{-}^{15}\text{N}$ и $8\text{-}^{15}\text{N}_3\text{,}^{15}\text{N}$ записаны на приборе «Bruker Avance II 400» в растворе DMSO-d_6 , внутренний стандарт — SiMe_4 (^{13}C , ^1H) и внешний стандарт — жидкий аммиак (^{15}N). Исследования методом ЯМР соединения $1\text{-}^2\text{H}_3\text{,}^{15}\text{N}_3$ проведены на спектрометре «Bruker Avance 700», укомплектованном датчиком тройного резонанса (^1H , ^{13}C , ^{15}N).

Константы спин-спинового взаимодействия $^{13}\text{C}\text{-}^{15}\text{N}$ были измерены с использованием метода нелинейной аппроксимации форм линий в 1D-спектрах ^{13}C , записанных с селективной развязкой от ядер ^{15}N и без нее¹². Для селективной развязки ^{15}N использовали адиабатические импульсы (WURST-20) длиной 10–20 мс и шириной диапазона инверсии ~1 кГц (14 м.д. для ^{15}N).

Масс-спектрометрическое исследование было выполнено на масс-спектрометре серии «MicrOTOF-Q II» фирмы «Bruker Daltonics» (Бремен, Германия) в режиме электро-спрей-ионизации (ESI).

^{15}N -Нитрит натрия (обогащение по ^{15}N 98%) был получен от фирмы ISOTEC. ^{15}N -Аминогуанидин $6\text{-}^{15}\text{N}$ (обогащение по ^{15}N 86%) синтезирован по описанной ранее методике¹³.

Этиловый эфир [^{15}N]-изонитрозоацетоуксусной кислоты ($5\text{B}\text{-}^{15}\text{N}$). К смеси 3 мл (23.72 ммоль) ацетоуксусного эфира и 4 мл AcOH при температуре 5–15 °C прибавили раствор 1.8 г (25.71 ммоль) $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ в 2.5 мл воды. Затем полученный раствор выдерживали 0.5 ч при температуре 15 °C и выпарили в 60 мл смеси воды и льда. Полученную суспензию выдерживали 16 ч и экстрагировали несколькими порциями этилацетата (4 × 15 мл). Экстракты объединили и после упаривания органического растворителя получили 1.9 г остатка в виде масла, которое потом использовали без дальнейшей очистки для синтеза нитроуксусного эфира ($3\text{-}^{15}\text{N}$). Выход ($5\text{B}\text{-}^{15}\text{N}$) 51%. Данные спектров ЯМР приведены с учетом существования оксима $5\text{B}\text{-}^{15}\text{N}$ в растворе DMSO-d_6 в двух изомерных формах (E/Z). Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, δ, м.д., J/Гц): 1.22 (т, 3 H, OCH_2CH_3 , J = 7.0); 1.23 (т, 0.3 H, OCH_2CH_3 , J = 7.0); 2.33 (с, 0.3 H, CH_3); 2.34 (с, 3 H, CH_3); 4.23 (к, 0.2 H, OCH_2CH_3 , J = 7.3); 4.24 (к, 2 H, OCH_2CH_3 , J = 7.0); 12.99 (уш.с, 0.1 H, N—OH); 13.25 (уш.с, 1 H, N—OH). Спектр ЯМР ^{15}N (40.5 МГц, δ, м.д.): 401.31; 396.86. Масс-спектр, m/z ($J_{\text{ом}}$ (%)): 161.05 [M + H]⁺ (100).

Этиловый эфир [^{15}N]-нитроуксусной кислоты ($3\text{-}^{15}\text{N}$). К суспензии 1.9 г соединения $5\text{B}\text{-}^{15}\text{N}$ и 6 мл воды прибавили раствор 3.1 г (10.40 ммоль) дигидрата бихромата натрия в смеси 7 мл воды и 2.5 мл конц. H_2SO_4 . Затем реакционную массу перемешивали 1.5 ч, выпарили в смесь 10 мл воды со льдом, а затем нагрели до комнатной температуры. Полученную суспензию обработали несколькими порциями этилацетата (4 × 15 мл). Экстракты объединили, высушили безводным Na_2SO_4 и после упаривания получили 1 мл маслянистого остатка, который в дальнейшем использовали для синтеза натриевой соли $1\text{-}^2\text{H}_3\text{,}^{15}\text{N}_3$ без дополнительной очистки. По данным спектроскопии ЯМР ^1H остаток представляет собой смесь соединений $5\text{B}\text{-}^{15}\text{N}$ и $3\text{-}^{15}\text{N}$ в соотношении 1 : 3. Спектр ЯМР ^1H $3\text{-}^{15}\text{N}$ (400 МГц, δ, м.д., J/Гц): 1.27 (т, 3 H, OCH_2CH_3 , J = 7.0); 4.24 (к, 2 H, OCH_2CH_3 , J = 7.0); 5.68 (д, 2 H, CH_2 , $^2J_{\text{N,N}} = 2.0$).

[^{15}N]-3-Амино-1,2,4-триазол-5-тион ($7\text{-}^{15}\text{N}$). К раствору 1.108 г (14.6 ммоль) роданистого аммония в 0.73 мл воды добавили 1.986 г (14.5 ммоль) карбоната аминогуанидина $6\text{-}^{15}\text{N}$. Реакционную массу перемешивали 1 ч при температуре 90–100 °C, а затем добавляли по каплям 6.9 мл концентрированной соляной кислоты в течение 2 ч. Далее

реакционную массу нагревали 0,5 ч при температуре 100 °С, добавили раствор 3,68 г (64,6 ммоль) КОН в 3,7 мл воды и нагревали 2 ч при 110–120 °С, охлаждали и фильтровали. Полученный раствор подкислили соляной кислотой до pH = 3–4, осадок отфильтровали, промыли 3–5 мл холодной воды и высушили. Выход 1,026 г (60%), т.пл. > 300 °С. Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$ (%)): 118,02 $[M + H]^+$ (100).

[²H₃,¹⁵N]-3-Амино-5-метилтио-1,2,4-триазол (8-²H₃,¹⁵N). К раствору 0,380 г (9,50 ммоль) NaOH в 9 мл воды прибавили 1,026 г (8,77 ммоль) [¹⁵N]-5-амино-1,2,4-триазол-5-тиона (7-¹⁵N) и охладили до 5 °С. Затем при перемешивании добавили 0,55 мл (8,83 ммоль, d 2,329) C²H₅I. Далее реакционную массу перемешивали 3–5 ч при температуре 10–15 °С и выдерживали 16 ч при комнатной температуре. Затем раствор фильтровали и концентрировали в вакууме до трети первоначального объема. После охлаждения до 0–5 °С образовавшийся осадок отфильтровали и высушили. Выход 0,764 г (63%), т.пл. 136–137 °С. Спектр ЯМР ¹³C (100 МГц, δ , м.д.): 13,12 C(5'); 156,88 C(5); 157,52 C(3). Спектр ЯМР ¹⁵N (40,5 МГц, δ , м.д.): 262,70. Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$ (%)): 135,05 $[M + H]^+$ (100).

Натриевая соль [²H₃,¹⁵N]-2-метилтио-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она (1-²H₃,¹⁵N₃). К суспензии 0,4 г (2,98 ммоль) амино-1,2,4-триазола 8-²H₃,¹⁵N в 3 мл воды добавили 0,5 мл 11 М HCl, охладили до 0 °С и прибавляли по каплям раствор 210 мг (3 ммоль) Na¹⁵NO₂ в 3 мл воды. Затем реакционную массу перемешивали 10 мин и добавили к охлажденной до 0 °С суспензии 7 мл 17%-ного раствора Na₂CO₃ и 0,6 мл смеси соединений 3-¹⁵N и 5В-¹⁵N, которая была получена ранее. Образовавшуюся реакционную массу перемешивали 2 ч при комнатной температуре, выпавший осадок отфильтровали и кристаллизовали из 50%-ной водной уксусной кислоты. Получено 0,45 г натриевой соли 1-²H₃,¹⁵N₃ в виде дигидрата. Выход 51%, т.пл. > 300 °С. Найдено (%): С, 20,85; Н, 2,93. С₅H₄²H₃N₃¹⁵N₃O₅SNa · 2 H₂O. Вычислено (%): С, 20,55; Н, 3,45. Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$ (%)): 233,00 $[M - Na]^+$ (100). Данные спектров ЯМР ¹³C и ¹⁵N представлены в таблице 1.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 10-03-01007-а), Министерства образования и науки РФ (государственные контракты П2444 от 19.11.2009 и 402.740.11.0260) и Совета по грантам

при Президенте Российской Федерации (программа государственной поддержки ведущих научных школ РФ, грант НШ-65261.2010.3).

Список литературы

1. T. E. Gaffney, C.-G. Hammar, B. Holmstedt, R. E. McMahon, *Anal. Chem.*, 1971, **43**, 307.
2. N. G. Knebel, S. R. Sharp, M. J. Madigan, *J. Mass Spectrom.*, 1995, **30**, 1149.
3. D. Artemov, Z. M. Bhujwalla, R. J. Maxwell, J. R. Griffiths, I. R. Judson, M. O. Leach, J. D. Glickson, *Magn. Reson. Med.*, 1995, **34**, 338.
4. W. C. Hutton, J. J. Likos, J. K. Gard, J. R. Garbow, *J. Labelled Compound*, 1998, **41**, 87.
5. T. R. Brown, *J. Clin. Pharmacol.*, 1998, **88**, 213.
6. В. Л. Русинов, Е. Н. Уломский, О. Н. Чупахин, М. М. Зубаиров, А. Б. Капустин, Н. И. Митин, М. И. Жиро-вский, И. А. Виноград, *Хим.-фарм. журн.*, 1990, № 9, 41 [*Pharm. Chem. J. (Engl. Transl.)*, 1990, **24**, No. 9, 646].
7. В. Л. Русинов, О. Н. Чупахин, Е. Н. Уломский, С. Л. Деев, Т. С. Шестакова, Е. Н. Уломский, Л. И. Русинова, О. И. Киселев, Э. Г. Деева, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2010, 135 [*Russ. Chem. Bull., Int. Ed.*, 2010, **59**, 136].
8. Пат. РФ 2294936; *Chem. Abstr.*, 2007, **146**, 315646.
9. I. Karpenko, S. Deev, O. Kiselev, V. Charushin, V. Rusinov, E. Ulomsky, E. Deeva, D. Yanvarev, A. Ivanov, O. Smirnova, S. Kochetkov, O. Chupakhin, M. Kukhanova, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010, **54**, 2017.
10. С. Я. Логинова, С. В. Борисевич, В. А. Максимов, В. П. Бондарев, С. К. Котовская, В. Л. Русинов, В. Н. Чару-шин, О. Н. Чупахин, *Антибиотики и химиотерапия*, 2010, **55**, 9 [*Antibiot. Khimioter.*, 2010, **55**, 9].
11. T. S. Shestakova, S. L. Deev, E. N. Ulomskiy, V. L. Rusinov, M. I. Kodess, O. N. Chupakhin, *ARKIVOC*, 2009, No. 4, 69.
12. S. L. Deev, Z. O. Shenkarev, T. S. Shestakova, O. N. Chupakhin, V. L. Rusinov, A. S. Arseniev, *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 8487.
13. O. N. Chupakhin, E. N. Ulomsky, S. L. Deev, V. L. Rusinov, *Synth. Commun.*, 2001, **31**, 2351.

Поступила в редакцию 3 февраля 2011

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполнения III этапа проекта:

- разработан методы включения изотопов ^{15}N в азольный цикл тетразола[5,1-с][1,2,4]триазинов, замещенных тетразола[1,5-а]пиримидинов и 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинов;

- для конденсированных производных пиримидина предложена схема включения в тетразольный фрагмент одновременно двух атомов ^{15}N ;

- на основе комплексного анализа гетероспиновых констант ^{13}C - ^{15}N и ^{15}N - ^1H разработан новый метод исследования строения аннелированных полиазотистых гетероциклов, который включает следующие этапы:

1. измерение КССВ ^{13}C - ^{15}N методами деконволюции спектральных линий в 1D ^{13}C -ЯМР спектрах, накопленных с селективной развязкой от ядер ^{15}N и эксперименты «спин-эхо»;

2. анализ спин-спиновых ^{15}N - ^1H взаимодействий с использованием 2D ^{15}N - ^1H ЯМР спектров, с последующим количественным измерением КССВ ^{15}N - ^1H методом «спин-эхо» экспериментом, проводимым с селективной инверсией ядер ^{15}N ;

- с помощью комплексного анализа констант ^{13}C - ^{15}N и химических сдвигов меченых атомов азота в спектрах 1D ^{15}N ЯМР исследована перегруппировка Димрота в незамещенном тетразола[1,5-а]пиримидине.

- показано, что анализ химических сдвигов меченых атомов азота, участвующих в координации с металлом в спектре 1D ^{15}N может быть критерием комплексообразования в ряду 1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов;

- с использованием анализа КССВ ^{15}N - ^1H в спектре 1D ^1H ЯМР исследована реакция алкилирования 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-онов (2-ацетоксиэтокси)метилацетатом в условия реакции гликозилирования по Форбрюггену и установлено, что продукт алкилирования по триазиновому циклу отвечает кинетическому контролю, а алкилирование по пиримидиновому циклу контролируется термодинамическими условиями;

- показан межмолекулярный характер изомеризации ацильных производных продуктов алкилирования 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-онов (2-ацетоксиэтокси)метилацетатом;

Представленные результаты показывают перспективность дальнейшего использования ^{15}N изотопномеченных азолазинов с учетом их спектральных характеристик (КССВ ^{13}C - ^{15}N , ^{15}N - ^1H , анализа химических сдвигов в спектрах 1D ^1H , ^{13}C и ^{15}N ЯМР). К настоящему моменту, разработанные в ходе выполнения проекта новые подходы ЯМР исследований, основанные на гетероядерных константах спин-спинового взаимодействия являются наиболее совершенными и эффективными физико-химическими методами исследования строения аннелированных полиазотистых гетероциклов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. A. Lycka, S. Frebort, N. Almonasy. *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 4213.
2. L. Filák, Z. Riedl, O. Egyed, M. Czugler, C.N. Hoang. *Tetrahedron*, 2008, **64**, 1103.
3. S. Guillou, G. Jacob, R. Goumont. *Tetrahedron*, 2009, **65**, 8891.
4. S.L. Deev, Z.O. Shenkarev, T.S. Shestakova, O.N. Chupakhin, V.L. Rusinov, A.S. Arseniev. *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 8487.
5. Joshi, K.C.; Chand, P. *J. Heterocyclic. Chem.*, **1980**, *17*, 1783.
6. Е.Н. Уломский, С.Л. Деев, А.В. Ткачев, И.К. Моисеев, В.Л. Русинов. *ЖОрХ*, 2002, **38** (2), 394.
7. С.Л. Деев, Е.Н. Уломский, В.Л. Русинов, О.Н. Чупахин. *Доклады Академии наук*, 2001, **379** (2), 214.
8. J. Farrás, E. Fos, R. Ramos, J. Vilarrasa. *J. Org. Chem.*, 1988, **53**, 887.
9. A. Lyčka, S. Lunák, T. Aysha, R. Holuša, R. Hrdina. *Tetrahedron Lett.*, 2010, **51**, 3149.
10. Messmer, G. Hajós, J. Tamás, A. Neszmélyi. *J. Org. Chem.*, 1979, **44**, 1823.
11. T.E. Gaffiney, C.-G. Hammar, B. Holmstedt, R.E. McMahon. *Anal. Chem.*, 1971, **43**, 307.
12. N.G. Knebel, S.R. Sharp, M.J. Madigan. *J. Mass Spectrom.*, 1995, **30**, 1149.
13. D. Artemov, Z.M. Bhujwalla, R.J. Maxwell, J.R. Griffiths, I.R. Judson, Leach M.O., J.D. Glickson. *Magn. Reson. Med.*, 1995, **34**, 338.
14. W.C. Hutton, J.J. Likos, J.K. Gard, J.R. Garbow. *J. Labelled Compound.*, 1998, **41**, 87.
15. T.R. Brown. *J. Clin. Pharmacol.* 1998, **88**, 213.
16. В.Л. Русинов, Е.Н. Уломский, О.Н. Чупахин, М.М. Зубаиров, А.Б. Капустин, Н.И. Митин, М.И. Жировецкий, И.А. Виноградов. *Хим.-фарм. журн.*, 1990, **4**, 41.

17. В.Л. Русинов, О.Н. Чупахин, Е.Н. Уломский, С.Л. Деев, Т.С. Шестакова, Е.Н. Уломский, Л.И. Русинова, О.И. Киселев, Э.Г. Деева. *Изв. АН Сер. хим.*, 2010, **1**, 135.
18. Пат. РФ 2294936; *Chem. Abstrs*, 2007, **146**, 315646.
19. I. Karpenko, S.L. Deev, O. Kiselev, V. Charushin, V. Rusinov, E. Ulomsky, E. Deeva, D. Yanvarev, A. Ivanov, O. Smirnova, S. Kochetkov, O. Chupakhin, M. Kukhanova. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010, **54**, 2017.
20. С.Я. Логинова, С.В. Борисевич, В.А. Максимов, В.П. Бондарев, С.К. Котовская, В.Л. Русинов, В.Н. Чарушин, О.Н. Чупахин. *Антибиотики и химиотерапия*, 2010, **55**, 9.
21. T.S. Shestakova, S.L. Deev, E.N. Ulomskii, V.L. Rusinov, M.I. Kodess, O.N. Chupakhin. *ARKIVOC*, 2009, **iv**, 69.
22. S.L. Deev, M.Y. Yasko, I.L. Karpenko, A.N. Korovina, A.L. Khandazhinskaya, V.L. Andronova, G.A. Galegov, T.S. Shestakova, E.N. Ulomskii, V.L. Rusinov, O.N. Chupakhin, M.K. Kukhanova. *Bioorg. Chem.*, 2010, **38**, 265.
23. R.G.W Spickett, S.H.B. Wright. *J. Chem. Soc., C* 1967, 498.
24. C.F.H. Allen, H.R. Beilfuss, D.M. Burness, G.A. Reynolds, J.F. Tinker, J.A. VanAllan. *J. Org. Chem.*, 1959, **24**, 787.
25. L.E. Brady, R.M. Herbst. *J. Org. Chem.*, 1959, **24**, 922.
26. J. Jiu, G.P. Mueller. *J. Org. Chem.*, 1959, **24**, 813.
27. O.N. Chupakhin, E.N. Ulomsky, S.L. Deev, V.L. Rusinov. *Synth. Communication*, 2001, **31**, 2351.
28. Sheldrick, G.M.; SHELXS-97, Program for the Solution of Crystal Structures: University of Göttingen: Göttingen, Germany, 1997.
29. Sheldrick, G.M.; SHELXL-97, Program for the Refinement of Crystal Structures, University of Göttingen: Göttingen, Germany, 1997.